Experimentelle Forschung Pharma, SCHERING AG Berlin
Department Endokrinpharmakologie

Leiter: Professor Dr. F. Neumann

UNTERSUCHUNGEN ZUM MAMMOTROPEN HORMONKOMPLEX DER RATTE, SPEZIELL ZUM GESTAGEN-PROLACTIN-SYNERGISMUS

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Terue Mizonobe
aus Osaka

Berlin 1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549616_0051

Experimentelle Forschung Pharma, SCHERING AG Berlin
Department Endokrinpharmakologie

Leiter: Professor Dr. F. Neumann

UNTERSUCHUNGEN ZUM MAMMOTROPEN HORMONKOMPLEX DER RATTE, SPEZIELL ZUM GESTAGEN-PROLACTIN-SYNERGISMUS

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Terue Mizonobe
aus Osaka

Berlin 1977

Referent: Professor Dr. F. Neumann

Korreferent: Professor Dr. J. Hammerstein

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 23. August 1977

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
1.1.	Gestagene Stoffe mit verschiedenen biologischen Teilwirkungen	1
1.2.	Aufbau der Milchdrüse	5
1.2.1.	Der postnatale Milchdrüsenaufbau	5
1.2.2.	Die hormonelle Steuerung des Milchdrüsenaufbaues	7
1.2.2.1.	Östrogene und Progesteron	7
1.2.2.2.	Der mammogene Hormonkomplex	8
1.3.	Regelmechanismus der Prolactin-Sekretion	11
1.3.1.	Prolactin	11
1.3.2.	Die Regulation der Prolactin-Sekretion	11
1.4.	Aufgabenstellung der Arbeit	15
II.	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1.	Tiermaterial und Behandlung	18
2.2.	Einteilung der Gruppen	18
2.3.	Serum-Prolactin-Bestimmung	19
2.3.1.	Testseren-Gewinnung	19
2.3.2.	Prolactin-Bestimmung	20
2.4.	Hypophysengewichte	23
2.5.	Präparation der Milchdrüsen	23
2.5.1.	"Whole-mount"-Präparation	23
2.5.2.	Milchdrüsenhistologie	24
2.5.3.	Milchdrüsengewichte	24
2.5.4.	DNS-Bestimmung	25
III.	ERGEBNISSE	28
3.1.	Körpergewichte	28
3.2.	Serum-Prolactin-Bestimmung	31
3.3.	Hypophysengewichte	36
3.4.	Präparation der Milchdrüsen	40

		Seite
3.4.1.	"Whole-mount"-Präparation	40
3.4.2.	Milchdrüsenhistologie	48
3.4.3.	Milchdrüsengewichte	62
3.4.4.	DNS-Bestimmung	67
IV.	DISKUSSION	71
V.	ZUSAMMENFASSUNG	75
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	77
VII.	DANKSAGUNG	100
VIII.	LEBENSLAUF	101

I. EINLEITUNG

1.1. Gestagene Stoffe mit verschiedenen biologischen Teilwirkungen

Unter dem 1947 zum ersten Mal vorgeschlagenen Ausdruck "Gestagene" (lateinisch: gestatio = Tragen, Trächtigkeit) werden die Stoffe zusammengefaßt, die nur zum Teil ähnliche Eigenschaften wie das physiologische Corpus luteum Hormon - Progesteron - besitzen (MIESCHER 1948).
Nach der erfolgreichen Isolierung, Synthese und Konstitutionsaufklärung des Progesterons im Jahre 1934 wurden zahlreiche synthetische Gestagene hergestellt (ALLEN & WINTERSTEINER 1934; HARTMANN & WETTSTEIN 1934; BUTENANDT, WESTPHAL & HOHLWEG 1934; SLOTTA, RUSCHIG & FELS 1934).
Besonders in den letzten Jahren erhöhte sich ihre Zahl, und in der Literatur wurden bereits etwa 1.000 Substanzen mit gestagenen Eigenschaften beschrieben (NEUMANN 1968). Trotz dieser recht umfangreichen Zahlen finden heute aber nur ca. 20 Verbindungen praktische Verwendung.
Abbildung 1 zeigt die Strukturformeln dieser Substanzen. Es sind entweder Pregnen- oder Androstenderivate.

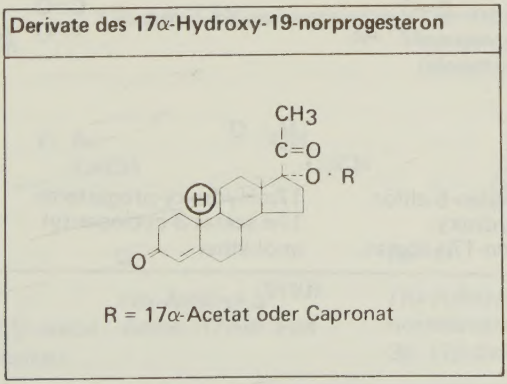
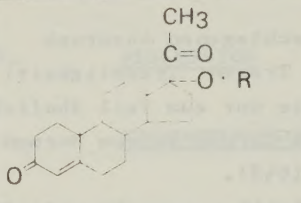
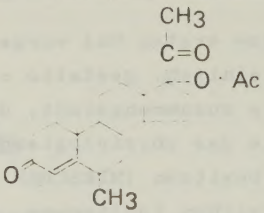


Abb. 1 Strukturformeln der am meisten angewandten Gestagene

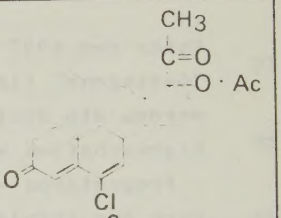
17α-Hydroxyprogesteron-Derivate



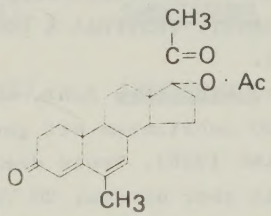
17α-Hydroxyprogesteron (R = Acetat oder Capronat)



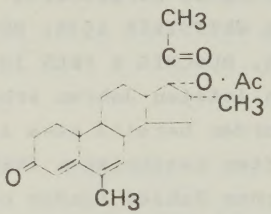
6α-Methyl-17α-hydroxy-progesteron-17α-acetat



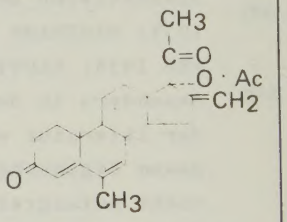
6-Chlor-Δ^6-17α-hydroxy-progesteron-17α-acetat



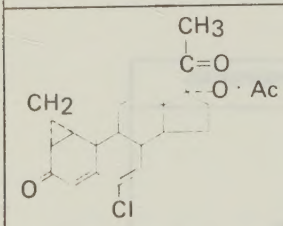
6-Methyl-Δ^6-17α-hydroxy-progesteron-17α-acetat



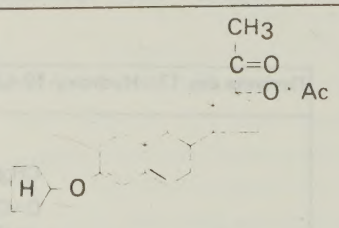
6,16α-Dimethyl-Δ^6-17α-hydroxy-progesteron-17α-acetat



6-Methyl-16-methylen-Δ^6-17α-hydroxy-progesteron-17α-acetat



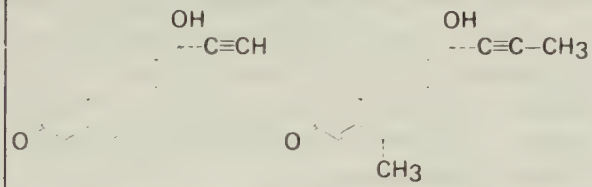
1,2α-Methylen-6-chlor-Δ^6-17α-hydroxy-progesteron-17α-acetat



17α-Hydroxy-progesteron 17α-acetat-3-cyclopentyl-enol-äther

Abb. 1 (Fortsetzung)

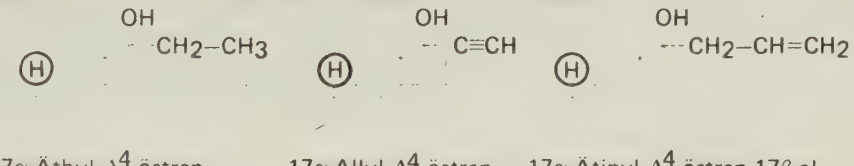
Testosteronderivate



17α-Äthinyl-testosteron (Athisteron)

6α,21-Dimethyl-17α-äthinyl-testosteron

Derivate des 3-Desoxo-19-nortestosteron

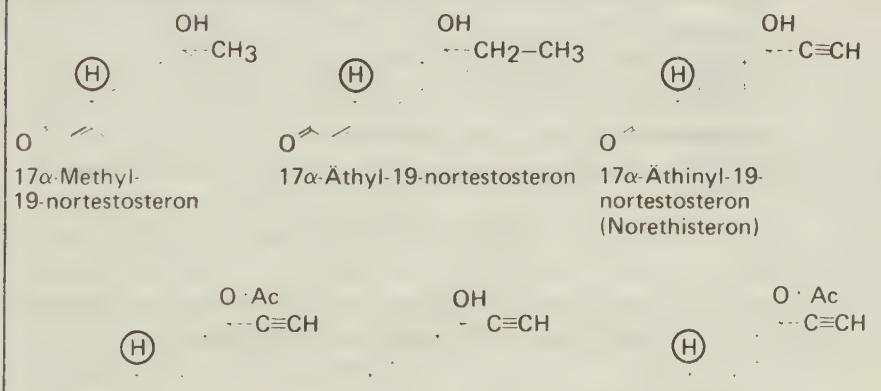


17α-Äthyl-Δ^4-östren-17β-ol

17α-Allyl-Δ^4-östren-17β-ol

17α-Ätinyl-Δ^4-östren-17β-ol

19-Nortestosteron-Derivate



17α-Methyl-19-nortestosteron

17α-Äthyl-19-nortestosteron

17α-Äthinyl-19-nortestosteron (Norethisteron)

17α-Äthinyl-19-nortestosteron-17β-acetat (Noresthisteronacetat)

17α-Äthinyl-$\Delta^{5(10)}$-östren-17β-ol-3-on

17α-Äthinyl-Δ^4-19-norandrosten-3β, 17β-diol-diacetat

Abb. 1 (Fortsetzung)

Die biologischen Wirkungen der Gestagene sind nicht einheitlich und bestehen aus vielen Teilwirkungen, die anhand geeigneter Teste bestimmt werden können (JUNKMANN 1963; NEUMANN 1968). Die wichtigsten dieser Teilwirkungen sind außer der eigentlichen gestagenen, schwangerschaftsbeeinflussenden Wirkung, antiöstrogene, östrogene, antiandrogene, androgene, gonadotropin-hemmende und die Nebennierenrindenfunktion beeinflussende Wirkungen (Abbildung 2).

Gestagen	Wirkung auf Cervix (antiöstrogene Wirkung)	Wirkung auf Uterus (Trans-	Schwangerschaftserhaltung	Zentrale Hemmwirkung	Androgen/anabole Wirkungw antiandrogene Wirkung	östrogene Wirkung Beeinflussung der ACTH-Sekretion	Virilisierung ♀ Foeten	Feminisierung ♂ Foeten
Progesteron	+	+	++	+	– –	– ↑	–	–
Hydroxyprogesteroncapronat (Depot)	+	+	+*	–	– –	– –(?)	–	–
Chlormadinonacetat	++	++	++*	+	– +	– ↓	–	+
Norethisteronacetat	++	++	±	++	+ –	+ ↑	+	–
Norethinodrel	–	±	–	+++	– –	++ ↑	?	?
Cyproteronacetat	++	++	++*	+	– ++	– ↓	–	++
Norgestrel (D-Norgestrel)	+++	++	+++	+++	++ –	– –	33	–
Medroxyprogesteronacetat	++	++	+++	++	– –	– ↓	+	±
Lynestrenol	++	++	±	++	+ –	+ ↑	+	–

* mit Östrogenzusatz + schwach ++ mittelstark +++ stark ↑ Stimulierung ↓ Hemmung

Abb. 2 Partialwirkungen von Gestagenen im Tierexperiment (in loser Anlehnung an HAMMERSTEIN)

Wie aus der Abbildung 2 ersichtlich ist, gibt es kaum eine Verbindung, die in ihrem Wirkungsspektrum vollkommen dem Progesteron entspricht. Außerdem unterscheiden sich bei verschiedenen Gestagenen die einzelnen Teilwirkungen voneinander, sowohl in ihrer quantitativen als auch in ihrer qualitativen

Ausprägung. Daher ist es wichtig, die Teilwirkungen der einzelnen Gestagene genau zu prüfen, weil je nach Indikation das eine oder das andere Gestagen auf Grund seines besonderen Wirkungsspektrums bevorzugt oder aber auch kontraindiziert sein kann (KLOPPER 1962; JUNKMANN 1963; UFER 1968).
Zum Beispiel: Gestagene mit androgenen oder antiandrogenen Eigenschaften sind zur Behandlung von Schwangerschaftsstörungen wegen der Virilisierungsgefahr bei weiblichen Feten (Androgene) oder Feminisierungsgefahr bei männlichen Feten (Antiandrogene) kontraindiziert (WILKINS 1958, 1959, 1960; GRUMBACH, DUCHARME & MOLOSHOK 1959; THOMSEN & NAPP 1960). Andererseits könnte sich ein Gestagen mit antiandrogener Teilwirkung als Kontrazeptivum bei Frauen mit leichter Akne günstig auswirken (AMANN & SPANKNEBEL 1964; FINNERUD & MC GRAE 1964).

1.2. Aufbau der Milchdrüse

1.2.1. Der postnatale Milchdrüsenaufbau

Wie bei den meisten Tieren vor der Pubertät zeigen die Milchdrüsen von Ratten ein mäßig entwickeltes Gangsystem mit gewisser Fett- und Bindegewebsproliferation, aber keinerlei Alveolenbildung (MYERS 1916, 1917, 1919; COWIE 1949; SILVER 1953a, 1953b; REECE 1958).
Zuerst verläuft das Wachstum der infantilen Milchdrüse, wahrscheinlich unter dem Einfluß von STH als Hauptwachstumsstimulans, mit der Körpergewichtszunahme linear (isometrisches Wachstum) (COWIE 1949; LYONS, LI & JOHNSON 1958; MAYER & KLEIN 1960).
Bei den Ratten - und auch bei anderen Tieren wie Mäusen, Kälbern usw. - erfährt dieses isometrische Wachstum bereits vor der Pubertät einen Wandel. Dann zeigen die Milchdrüsen eindeutig erhöhte Wachstumsraten im Vergleich zu den übrigen Körperteilen (allometrisches Wachstum) (HUXLEY & TEISSIER 1936; COWIE 1949; SILBER 1953b; FLUX 1954; FOLLEY 1956; MAYER & KLEIN 1960; COWIE & FOLLEY 1961; SINHA & TUCKER 1966).

Eine Kastration in dieser Phase ruft eine Senkung der Wachstumsrate wieder auf das Niveau des isometrischen Wachstums hervor (COWIE 1949; RICHARDSON 1955). Diese Tatsachen zeigen, daß am Wachstum der infantilen Milchdrüsen bereits das Ovar beteiligt ist.

Mit dem Beginn der Pubertät - durch das Einsetzen der vollen Funktion des Ovars - findet eine grundlegende Wandlung in der endokrinen Steuerung des Milchdrüsenwachstums statt. An Stelle von STH spielen von nun an Östradiol, Progesteron und Prolactin die wichtigste Rolle.

Die Tubuli des Gangsystems verzweigen sich vielfach und wachsen in das auch proliferierende umgebende Fettgewebe. Epithelsprossen aus ihren Wänden bilden End- und Seitenknospen. Diese Epithelverdickungen sind ohne Lumen, die aber in der Schwangerschaft durch Lumenbildung zu Acini und schließlich zu Alveolen werden.

Die Bindegewebssepten, welche die Milchdrüse in Lobuli unterteilen, dienen als Leitweg des Wachstums. Nach der Pubertät können die ersten Zyklen eine gewisse Weiterentwicklung der Drüsen bewirken (MAYER & KLEIN 1960).

Ein fortgeschrittener tubulo-alveolärer Aufbau der Drüse kann schon während des normalen Zyklus bei den Tieren mit langer Lutealphase - wie zum Beispiel beim Hund (MARSHALL & HALNAN 1917) - beobachtet werden; bei den Tieren mit kurzen Sexualzyklen oder mit sehr kurzen Lutealphasen bei vorherrschender Follikelphase entwickelt sich dagegen vorwiegend das Gangsystem. Ratten gehören zu der zweiten Gruppe, und nur wenn durch eine Schwangerschaft oder eine Pseudogravidität die Lutealphase verlängert ist, kommt es zum vollständigen tubulo-alveolären Aufbau (FREYER & EVANS 1923; TURNER & SCHULTZE 1931; SCHULTZE & TURNER 1933; COLE 1933; WEICHERT, BOYD & COHEN 1934).

1.2.2. Die hormonelle Steuerung des Milchdrüsenaufbaues

1.2.2.1. Östrogene und Progesteron

Die stimulierende Wirkung der Östrogene und des Progesterons auf die Milchdrüsen wurde in zahlreichen Experimenten beschrieben. Die Untersuchungen wurden an intakten und ovariektomierten Tieren durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Dosen und Kombinationen getestet. Die Ergebnisse zeigten, daß die einzelnen Species - nach ihrer Milchdrüsenreaktion auf Ovarsteroide - in drei Gruppen eingeteilt werden können.

Die erste Gruppe zeigt eine Gangentwicklung bei alleiniger Östrogengabe in physiologischen Dosen, aber zu einem tubuloalveolären Wachstum kommt es nur bei einer kombinierten Wirkung von Östrogenen und Progesteron. Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel Kaninchen, Katzen, Ratten und Mäuse (LYONS & MC GINTY 1941 ; SCHARF & LYONS 1941; CURTIS 1949; FOLLEY 1956; YAMAMOTO & TURNER 1956).

Bei der zweiten Gruppe können Östrogene allein beide Anteile des Milchdrüsenparenchyms stimulieren, aber zu einem optimalen tubulo-alveolären Wachstum kommt es auch hier nur bei einer Kombination von Östrogenen und Progesteron (z.B. bei Meerschweinchen, Ziegen, Rindern, Schafen, Schweinen, Affen) (MIXNER & TURNER 1943; COWIE, FOLLEY, MALPRESS & RICHARDSON 1952; BENSON, COWIE, COX, FLUX & FOLLEY 1955; SMITH & RICHTERICH 1956, 1958; BENSON, COWIE, COX & GOLDZVEIG 1957).

Bei den Hündinnen und Frettchen, die zu der dritten Gruppe gehören, ist mit Östrogenen allein weder eine nennenswerte Gangentwicklung noch ein tubulo-alveoläres Wachstum zu erreichen. Dagegen kann Progesteron allein das Gangsystemwachstum und in unphysiologisch hohen Dosen auch das tubuloalveoläre Wachstum auslösen (TURNER & GOMEZ 1934; HUGGINS & MOULDER 1944; FOLLEY 1952, 1955).

Im allgemeinen können aber den Östrogenen und dem Progesteron

folgende spezifische biologische Wirkungen in Bezug auf das Milchdrüsenwachstum zugeschrieben werden:
Östrogene wirken mehr wachstumsfördernd und stimulieren das Gangsystem.
Progesteron wirkt mehr differenzierend und fördert einen tubulo-alveolären Aufbau der Milchdrüse.
Beim Zusammenwirken beider Hormone kommt es nicht nur zu einer Addition der beiden oben genannten Wirkungen, sondern auch zu einer Beschleunigung des proliferierenden und differenzierenden Vorganges (REECE, TURNER & HILL 1936; REECE & BIVINS 1942; REECE & LEATHEM 1945; BENSON, COWIE, COX, FLUX & FOLLEY 1955; BENSON, COWIE, COX & GOLDZVEIG 1957; HÖHN 1957; BENSON, COWIE, FOLLEY & TINDALL 1959; TRAURIG & MORGAN 1964).

1.2.2.2. Der mammogene Hormonkomplex

Obwohl ein gewisser direkter Einfluß der Ovarsteroide auf die Milchdrüsen zu vermuten ist, weil bei vollständig hypophysektomierten Tieren noch eine geringe Stimulierung des Parenchyms, besonders des Gangsystems, mit Östrogenen oder Progesteron allein - oder in Kombination - erreicht wurde, ist für den normalen Aufbau der Milchdrüse die Anwesenheit der Hypophyse nötig (GARDNER 1940, 1941; LEONARD 1943; SMITHCORS & LEONARD 1943; JACOBSOHN 1954; MEITES 1966).
Bei den hypophysektomierten Tieren rufen weder Östrogene noch Progesteron - noch die Kombination der beiden - ein zufriedenstellendes Milchdrüsenwachstum hervor (GOMEZ & TURNER 1937; LYONS & PENCHARZ 1936; NATHANSON, SHAW & FRANSEEN 1939, REECE & LEONARD 1941; SAMUELS, REINECKE & PETERSEN 1941; LEONARD & REECE 1942; REECE & LEATHEM 1945; FOLLEY 1947a, 1947 b, 1952; HAHN & TURNER 1966).
Erst wenn noch zusätzlich Hypophysenhormone verabfolgt oder Hypophysentransplantate eingesetzt werden, kommt es zu einem vollständigen Drüsenaufbau (REECE & LEONARD 1941; GARDNER & WHITE 1941; GOMEZ 1942; LYONS, SIMPSON & EVANS 1943; MIXNER & TURNER 1943).

Einige Experimente mit zweifach oder dreifach operierten Tieren (Ovariektomie, Hypophysektomie, Adrenalektomie) sowie eine Reihe von in vitro Versuchen wurden durchgeführt, um festzustellen, welche Hormone des Hypophysenvorderlappens eine mammogene Wirkung besitzen. Dabei stellte sich heraus, daß eine Kombination von Östrogenen, somatotropem Hormon (STH) und Corticoiden (oder ACTH bei nicht adrenalektomierten Tieren) das Gangsystemwachstum stimuliert, aber für den vollständigen tubulo-alveolären Aufbau der Milchdrüse noch zusätzlich Progesteron und Prolactin benötigt wurden (MIXNER & TURNER 1942; LYONS, LI & JOHNSON 1953, 1958; FERGUSON 1956; FLUX 1958; HARDFIELD & YOUNG 1958; COWIE & LYONS 1959; COWIE, TINDALL & YOKOYAMA 1966). Der heute gültige gesamte mammogene Hormonkomplex besteht also mindestens aus folgenden 5 Hormonen:

1) Gestagene (Progesteron)
2) Östrogene
3) Prolactin
4) Somatotropes Hormon (STH)
5) Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)
   - indirekt über Corticoide wirksam -

(S. Abbildung 3)

Prolactin nimmt dabei als das wichtigste Hormon für den vollständigen Milchdrüsenaufbau bei den meisten Spezies eine vorrangige Stellung ein. Ohne Prolactin ist ein vollständiger tubulo-alveolärer Aufbau nicht möglich (LYONS, LI, COLE & JOHNSON 1953; LYONS, LI & JOHNSON 1958; FLUX 1958). Andererseits besitzt Prolactin wahrscheinlich auch eine direkte mammogene Wirkung (LYONS, LI & JOHNSON 1953; MIZUNO, IIDA & NAITO 1955; MIZUNO & NAITO 1956; FERGUSON 1956; HARDFIELD & YOUNG 1958).
Wenn Prolactin, STH und ACTH in genügend hohen Konzentrationen vorhanden sind, so gelingt in Abwesenheit von Ovarhormonen eine Stimulierung des Milchdrüsenwachstums (CLIFTON & FURTH 1960; TALWALKER & MEITES 1961, 1964; GOMEZ 1942; DAO & GAWLAK 1963; MEITES & KRAGT 1964).

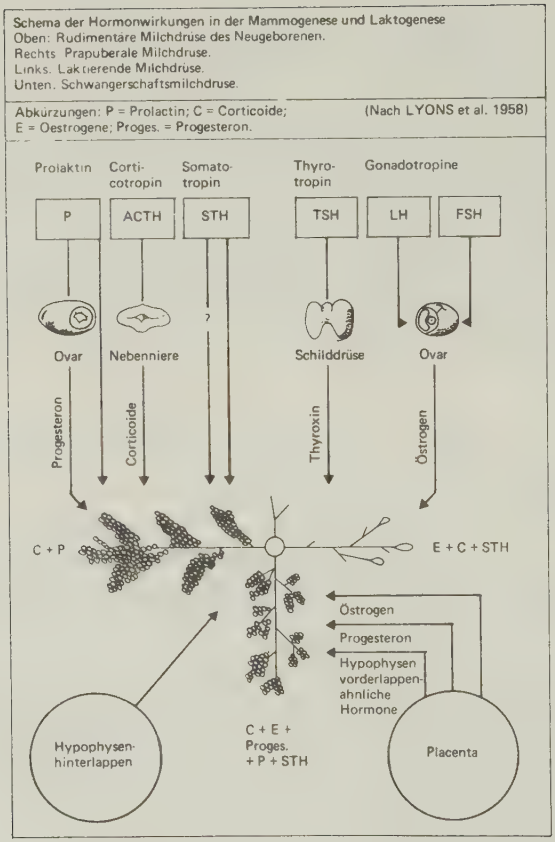


Abb. 3 Schema der Hormonwirkungen in der Mammogenese und Laktogenese

Als weitere mammogene Stoffe wurden verschiedene andere Hormone angeführt, z.B. Insulin (AHREN & JACOBSOHN 1956; AHREN & ETIENNE 1958; JACOBSOHN 1958; AHREN 1959a, 1959b; KOZIOROWSKA 1962; KUMARESAN & TURNER 1965, 1967) oder Thyroxin (MIXNER & TURNER 1942b, SMITHCORS & LEONARD 1942; PETERSEN, KNODT, LUDWICK & POMERDY 1944; KUMARESAN & TURNER 1965). Es ist aber schwierig, die allgemeinen Stoffwechselwirkungen dieser Hormone von den spezifischen mammogenen Wirkungen zu trennen.

1.3. Regelmechanismen der Prolactinsekretion

1.3.1. Prolactin

Prolactin (LTH) ist ein Proteohormon. Es wird in den acidophilen (alpha-) Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und direkt an das zirkulierende Blut abgegeben (FARQUAR & RINEHART 1954; HYMER, MC SHANN & CHRISTIANSEN 1961; BARRNET, ROTH & SAIZER 1961; RENNELS 1962; GIROD 1962, 1964; EMMART, BATES & TURNER 1965).
Bei einigen Spezies - zum Beispiel bei Ratten - wirkt Prolactin auch luteotrop (ASTWOOD 1941; DESCLIN 1952; EVERETT 1956; LYONS, LI & JOHNSON 1958; WOLTHUIS 1963a, 1963b; MEITES & NICOLL 1966).

1.3.2. Die Regulation der Prolactinsekretion

Die Hypophysenfunktion wird von übergeordneten Zentren des Hypothalamus gesteuert. Die Prolactinfreisetzung geschieht demnach auch unter der Kontrolle dieser höheren Zentren, sie bilden nämlich neben Gonadotropin-Releasing-Factors einen Prolactin-Inhibiting-Factor (PIF), der eine hemmende Wirkung auf die Prolactinsekretion ausübt. Die Existenz des PIF wurde nachgewiesen, indem man eine vermehrte Prolactinsekretion beobachtete, wenn entweder durch Läsionen im Hypothalamus, Hypophysenautotransplantation bei Hypophysektomierten oder Hy-

pophysenvorderlappen-Inkubation in vitro eine Befreiung des Hypophysenvorderlappens von hypothalamischen Einflüssen stattfand. Es wurde weiterhin nachgewiesen durch den Rückgang der vermehrten Sekretion, wenn die Reimplantation der Hypophyse in den Hypothalamus vorgenommen wurde oder ein Extrakt aus der Eminentia mediana verabfolgt wurde. (NIKITOVITCH-WINER & EVERETT 1958; MC CANN & FRIEDMANN 1960; NICOLL & MEITES 1962; SAWYER, HAUN, HILLIARD, RADFORD & KANEMATSU 1963; WOLTHUIS & DE JONGH 1963; WOLTHUIS 1963b; RATNER, TALWALKER & MEITES 1963; KANEMATSU, HILLIARD & SAWYER 1963; KOBAYASHI, KOBAYASHI, KIGAWA, MIZUNO & AMENOMORI 1963; BEN-DAVID, DIKSTEIN & SULMAN 1964; RAMIREZ & MC CANN 1964; GROSVENOR, MC CANN & NALLAR 1965; NIKITOVITCH-WINER 1965; MISHKINSKY, LAJTOS & SULMAN 1966; ROBBOY & KAHN 1966; DE VOE, RAMIREZ & MC CANN 1966; KUROSHIMA, ARIMURA, BOWERS & SCHALLY 1966; CHOWERS & MC CANN 1967; SAR & MEITES 1967; GROSVENOR, MENA, DHARIVAL & MC CANN 1967; ARIMURA, SAITO, MÜLLER, BOWERS, SAWAND & SCHALLY 1967; DHARIVAL, GROSVENOR, ANTUNES-RODRIGUES & MC CANN 1968; CHEN, AMENOMORI, LU, VOOGT & MEITES 1970.)

Bei manchen Tieren - zum Beispiel bei Ratten - existiert zwischen den PIF-bildenden Zentren und Östrogenen ein positiver Feedback-Mechanismus. Je höher der Östrogenspiegel, desto weniger PIF und desto mehr Prolactin werden freigesetzt. (MEITES & TURNER 1942; EVERETT 1956, 1964; KANEMATSU & SAWYER 1963; WOLTHUIS & DE JONGH 1963; RATNER, TALWALKER & MEITES 1963; WOLTHUIS 1963b; BEN-DAVID, DIKSTEIN & SULMAN 1964; RATNER & MEITES 1964; TALWALKER, MEITES & MIZUNO 1964; RAMIREZ & MC CANN 1964; NICOLL & MEITES 1962; MEITES & NICOLL 1966; TUCKER, PAAPE & SINHA 1967; CHOWERS & MC CANN 1967; SAR & MEITES 1967; MINAGUCHI, CLEMENS & MEITES 1968.)

Andererseits wirken die Östrogene auch direkt auf die Hypophyse ein und setzen das Prolactin frei (NICOLL & MEITES 1962, 1964; KANEMATSU & SAWYER 1963; MEITES & NICOLL 1965; CHEN, AMENOMORI, VOOGT & MEITES 1970).

In einer positiven Feedback-Beziehung zu den hypothalamischen Zentren stehen außer Östrogenen noch andere Hormone wie Corticosteroide (SULMAN, BEN-DAVID, DAWON, DIKSTEIN, KHAZAN, MISHKINSKY & ZOR 1963/1964; SAR & MEITES 1968) und Testosteron (WOLTHUIS 1963b; AHREN & ETIENNE 1959; SAR & MEITES 1968) bei weiblichen Tieren.

Der Feedback-Effekt von Progesteron (ROTHCHILD & OLCKEY 1960; WOLTHUIS 1963b; SAR & MEITES 1968) besitzt unter physiologischen Bedingungen kaum Bedeutung, weil dieses Hormon gleichzeitig gegenüber Östrogenen eine antagonistische Wirkung ausübt und dadurch die prolactinsekretion-stimulierende Wirkung der Östrogene aufgehoben wird. Außerdem macht Progesteron die Milchdrüse gegen Prolactin refraktär (MEITES 1954; MEITES & TURNER 1942, CHEN & MEITES 1969, 1970).

Adequate exogene Reize fördern - auch über eine Verminderung des PIF - die Freisetzung des Prolactins.
Zum Beispiel der Saugreiz (GROSVENOR & TURNER 1958; RATNER & MEITES 1964; GROSVENOR, MENA & SCHAEFGEN 1967; MINAGUCHI & MEITES 1967; TUCKER, PAAPE & SINHA 1967; SAR & MEITES 1969; AMENOMORI, CHEN & MEITES 1970) und die Cervix-Reizung (HERLYN, GELLEP, VON BERSWORDT-WALLRABE & VON BERSWORDT-WALLRABE 1965; KUROSHIMA, ARIMURA, BOWERS & SCHALLY 1966).

Zwischen dem zirkulierenden Prolactin und den PIF-produzierenden Zentren scheint auch eine Art negativer Feedback-Mechanismus zu existieren. Erhöhte Prolactin-Konzentrationen in der Peripherie bewirken eine vermehrte PIF-Freisetzung im Hypothalamus und daher eine verminderte Prolactinsekretion der Hypophyse (CHEN, MINAGUCHI & MEITES 1967; WELSCH, NEGRO-VILAR & MEITES 1968; SINHA & TUCKER 1968; MENA, MAIWEG & GROSVENOR 1968).
Die Abbildung 4 zeigt eine Zusammenfassung über die Regulation der Prolactinsekretion.

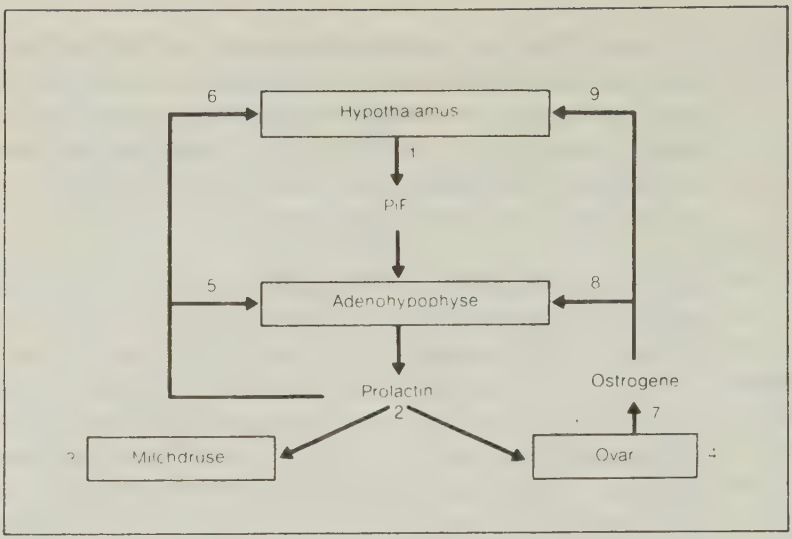


Abb. 4 Die Regulation der Prolactinsekretion

1. Bildung von Prolactin-Inhibiting-Factor (PIF) im Hypothalamus und seine Sekretion (Neurosekretion)

2. Prolactinsekretion im Hypophysenvorderlappen in Abhängigkeit von der PIF-Konzentration

3. Unter Prolactineinwirkung vollkommener lobuloalveolärer Milchdrüsenaufbau

4. Das Ovar wird durch Prolactin zu vermehrter Progesteronproduktion angeregt (bei Ratten)

5. Peripheres Prolactin hemmt direkt die hypophysäre Prolactinfreisetzung?

6. Erhöhte periphere Prolactinkonzentrationen hemmen indirekt über den PIF die hypophysäre Prolactin-Freisetzung?

7. Das Ovar produziert Östrogene

8. Östrogene wirken direkt auf die Hypophyse und fördern die hypophysäre Prolactinsekretion

9. Östrogene hemmen die PIF-Ausschüttung und bewirken eine vermehrte Prolactinfreisetzung

1.4. Aufgabenstellung der Arbeit

Ein vollständiger tubulo-alveolärer Aufbau der Milchdrüse von Ratten gelingt nur, wenn Prolactin und Progesteron wirksam werden. Östrogene haben - wenn man von einer Förderung des Gangwachstums absieht - keinen direkten Effekt. Sie stimulieren aber via Hemmung des PIF die Prolactinsekretion. Da Prolactin bei der Spezies Ratte das luteotrope Hormon ist, wird durch Östrogene so indirekt die Progesteronsynthese stimuliert. Diese Situation ist in Abbildung 5 dargestellt.

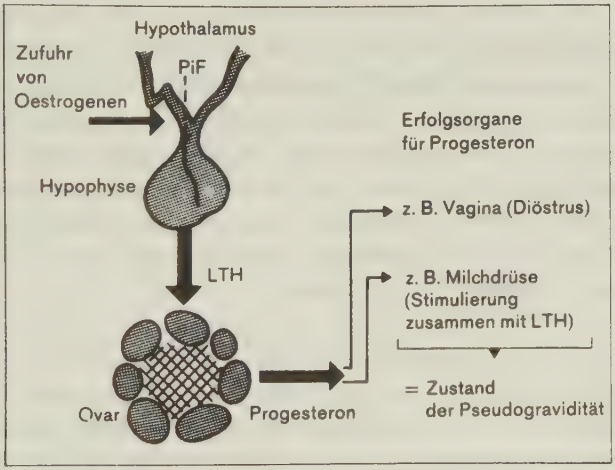


Abb. 5 Was geschieht bei der Ratte nach Östrogenzufuhr?

Es war ein Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, wie sich bei Unterbrechung des in Abbildung 5 aufgezeigten Regelkreises (Ausschaltung der Ovarien) die Gaben von Östron allein und in Kombination mit Progesteron auf die Milchdrüsenentwicklung der Ratte auswirkt, um eine genauere Kenntnis über den Prolactin-Progesteron-Synergismus zu erhalten. (Die Prolactinsekretion wird durch Östrogene stimuliert.) Dazu war es erforderlich, die Prolactin-Serumspiegel zu verfolgen.

Einige synthetische Gestagene besitzen auch ausgeprägte östrogene Eigenschaften. Ein solches Gestagen sollte sich in seiner Wirkung auf die Milchdrüse der Ratte ähnlich verhalten wie eine entsprechende Kombination von Östron und Progesteron.

Es war das zweite Ziel dieser Arbeit, ein solches Gestagen daraufhin zu untersuchen. Es wurde Norethynodrel ausgewählt. Es sollte festgestellt und quantifiziert werden, inwieweit sich die beiden Partialwirkungen (gestagene und östrogene) des Norethynodrels auf die Milchdrüse synergistisch auswirken.

Norethynodrel (17α-Äthinyl-5(10)-oestren-17ß-ol-3-on) findet als Kontrazeptivum in der Kombination mit Mestranol (17α-Äthinylöstradiol-3-methyläther) breite Anwendung. Dieses Hormon zeigt im CLAUBERG-Test am Kaninchen einen ganz marginallen Effekt und wirkt bei Ratten abortiv (PINCUS, CHANG, HAFEZ, ZARROW & MERRILL 1956; PINCUS, CHANG, ZARROW, HAFEZ & MERRILL 1956; SAUNDERS & DRILL 1957, 1958; DRILL 1959, 1962; NEUMANN & ELGER 1970).

Die Ovarien intakter Ratten, die täglich 3.0 mg Norethynodrel erhielten, zeigten eine deutliche Stimulierung der Corpora lutea bei einer Atrophie des follikulären Anteils. Hier verursachte vermutlich die östrogene Partialwirkung von Norethynodrel eine vermehrte hypophysäre Prolactinsekretion und Prolactin als luteotropes Hormon bei Ratten unterhielt die weitere Progesteronbildung im Ovar. Sonst wird bei Gabe so hoher Gestagendosen über eine Gonadotropinhemmung eine Atrophie aller geweblichen Komponenten des Ovars, aber besonders der Corpora lutea, verursacht (BAKER, KAHN & BESEMER 1965; MINAGUCHI & MEITES 1967; NEUMANN & ELGER 1970).
Bei der Messung des Sialingehaltes in der Mäusevagina verhielt sich Norethynodrel ebenfalls wie ein Östrogen, d.h. die gestagene Komponente kam überhaupt nicht zum tragen (NISHINO & NEUMANN 1971).

An der Milchdrüse von Ratten zeigte sich, daß Norethynodrel bei intakten und ovariektomierten, nicht aber bei hypophysektomierten Ratten einen tubulo-alveolären Drüsenaufbau erzeugen kann (KAHN & BAKER 1964; KAHN, BAKER & ZANOTTI 1965). Norethynodrel oder eine Kombination von Norethynodrel mit Mestranol (25:1) verursachten bei intakten Ratten außer einem tubulo-alveolären Milchdrüsenaufbau auch eine Erhöhung des Hypophysenvorderlappengewichtes und hypophysären Prolactingehaltes sowie eine Erniedrigung der PIF-Konzentration im Hypothalamus (HOLMES & MANDL 1962; MINAGUCHI & MEITES 1967). Aus diesen Experimenten läßt sich vermuten, daß die östrogene Teilwirkung des Norethynodrels einen vermehrten Prolactin-Release - sei es via Hemmung des PIF oder über eine direkte Wirkung auf die Hypophyse - verursacht.

II. MATERIAL und METHODEN

2.1. Tiermaterial und Behandlung

Die Untersuchungen wurden an 160 bis 180 g schweren weiblichen BRÜNGER-Ratten durchgeführt. Alle Tiere wurden unter Äthernarkose bei möglichst sterilen Bedingungen bilateral ovariektomiert. Nach der Operation wurden die Tiere 2 Wochen lang ruhig gehalten.

Am 15. Tag nach Ovariektomie wurde mit der Behandlung begonnen. Die Tiere wurden nach Zufall in 13 Gruppen eingeteilt. Als Injektionsmaterial wurde Östron in Sesamöl, Progesteron und Norethynodrel wurden in einem Benzylbenzoat-Rizinusöl-Gemisch gelöst. Die Hormon-Injektion erfolgte täglich in das subkutane Gewebe des Rückens.

Die Gruppen 1, 2, 3, 4 und 5 wurden mit je 0.1 ml Progesteron- und Östronlösung und die Gruppen 6, 7 und 8 mit 0.1 ml Östron 18 Tage lang behandelt. Die dazugehörende Kontrollgruppe 9 wurde mit 0.1 ml Benzylbenzoat-Rizinusöl-Gemisch behandelt. Die Tiere der Gruppen 10, 11 und 12 erhielten 16 Tage lang je 0.1 ml Norethynodrellösung injiziert. Als Kontrollgruppe wurde Gruppe 13 nur mit Lösungsmittel (Benzylbenzoat-Rizinusöl-Gemisch) behandelt.

Am Tag nach der letzten Injektion wurden die Tiere dekapitiert und weiterverarbeitet.

2.2. Einteilung der Gruppen (s. Tabelle 1)

Zeichenerklärung zu Tabelle 1:

OE = bilaterale Ovariektomie
P = 0.1 ml Progesteronlösung, 18 Tage lang s.c.
Ö = 0.1 ml Östronlösung, 18 Tage lang s.c.
N = 0.1 ml Norethynodrellösung, 16 Tage lang s.c.
Öl = Ölkontrolle

Tab. 1 Gruppeneinteilung

Gruppe	Anzahl der Tiere (n)	Behandlung	
1	6	OE	1 µg Ö + 3 mg P
2	6	OE	3 µg Ö + 3 mg P
3	6	OE	10 µg Ö + 3 mg P
4	6	OE	30 µg Ö + 3 mg P
5	6	OE	100 µg Ö + 3 mg P
6	6	OE	1 µg Ö
7	6	OE	10 µg Ö
8	6	OE	100 µg Ö
9	5	OE	Öl
10	6	OE	1 mg N
11	6	OE	3 mg N
12	6	OE	10 mg N
13	5	OE	Öl

2.3. Serum-Prolactin-Bestimmung

2.3.1. Testseren-Gewinnung

Am Tage nach der letzten Injektion wurde jedes Tier dekapitiert und das Blut aus den Halsgefäßen in Zentrifugen-Röhrchen gesammelt. Die Glasröhrchen wurden im Eisbad deponiert. Die durch Zentrifugieren gewonnenen Testseren wurden bis zum Tage der Analyse im Tiefkühlschrank (-20° C) aufbewahrt.

2.3.2. Prolactin-Bestimmung

Die radioimmunochemische Methode (Doppelantikörper-Methode) erlaubt, den Serum-Prolactin-Gehalt im pg(10^{-12}g)- bis ng(10^{-9}g)Bereich zu stimulieren.
Das Prinzip dieser Methode basiert auf folgenden Tatsachen:

- Als ein Proteohormon besitzt Prolactin eine antigene Eigenschaft und reagiert mit seinem spezifischen Antikörper immunologisch.

- Wenn radioaktiv markiertes und unmarkiertes Antigen mit ihrem spezifischen Antikörper zusammentreffen, findet zwischen beiden eine kompetitive Antigen-Antikörper-Reaktion statt. Unter günstiger Bedingung läuft diese Reaktion nach dem Massenwirkungsgesetz reversibel ab und es stellt sich ein Gleichgewicht ein.

Antigen* + Antikörper ⇌ Antigen*-Antikörper
Antigen + Antikörper ⇌ Antigen - Antikörper

Antigen* = radioaktiv markiertes Antigen

- Durch die Messung der Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes kann der Gehalt des unmarkierten Antigens (hier Prolactin) im Testserum bestimmt werden, da nach dem Isotopenverdünnungsprinzip die Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes im gleichen Maße abnimmt wie die Konzentration des unmarkierten Antigens (hier zu bestimmendes Prolactin) im Testserum zunimmt (BERSON & YALLOW 1968).

Für die Markierung von hochgereinigtem Ratten-Prolactin (NIAMD-Rat-Prolactin-I-1) wurde die Chloramin-T-Methode angewandt (GREENWOOD, HUNTER & GLOVER 1963).
Jodidnuklid (NaJ^{131}) wurde durch Chloramin T zu kationischem Jod (J^{131+}) oxydiert. Dieses substituierte H-Atome der Tyrolreste des Prolactins. Nicht proteingebundenes freies J^{131+} wurde anschließend mit Natriumdisulfit bis zum J^{131-} reduziert. Während dieses Vorganges wurde das pH unter

Anwendung von Phosphatpuffer im optimalen Bereich (pH = 7,5) gehalten. Nach Abschluß der Markierung wurde das radioaktive Prolactin von nicht in die Reaktion eingegangenem Jodid und niedermolekularen Degradationsprodukten säulenchromatographisch abgetrennt.
Prolactin-J^{131}-Moleküle passieren die Biogel-P-60-Säule schneller als die anderen Moleküle wie NaJ^{131}, Degradationsprodukte, Chloramin T usw. Der erste radioaktive Gipfel des Eluats repräsentiert das Prolactin-J^{131}.

Für die Herstellung der Standardkurve wurde NIAMD-Rat Prolactin-RP-1 mit biologischer Aktivität von ca. 11 I.U./mg zur Verfügung gestellt.

Das durch Immunisierung mit Ratten-Prolactin gewonnene Kaninchenserum (NIAMD-Anti-Rat Prolactin S-1) diente als spezifischer Ratten-Prolactin-Antikörper. Anhand des Vorversuches wurde die geeignete Verdünnung für den spezifischen Antikörper festgestellt, bei welcher das Antiserum ungefähr 50 % des Prolactin-J^{131} in Abwesenheit des unmarkierten Antigens band. Bei dieser starken Verdünnung blieb die Löslichkeit des Antigen-Antikörper-Komplexes erhalten.

Um das freie markierte Antigen vom antikörper-gebundenen zu trennen, wurde der zweite Antikörper zugegeben (HALES & RANDLE 1963). Das gegen die Kaninchen-Gamma-Globuline gerichtete Antiserum von Eseln (der zweite Antikörper) reagierte mit dem spezifischen Antikörper von Kaninchen (der erste Antikörper). Dieser Vorgang verursachte eine Präzipitation des löslichen Antigen-Antikörper-Komplexes und ermöglichte die Trennung des Antigen-Antikörper-Komplexes vom nicht gebundenen Antigen.

Durchführung des Prolactin-Radioimmunoassays:

1. Teströhrchen wurden im Eisbad deponiert.
2. Standard NIAMD RP-1 wurde so in Phosphatpufferlösung (mit 1 % humanem Serum-Albumin-Zusatz) verdünnt, daß

... sich der Standardkurvenbereich von 250 pg ~50 ng/ 400 µl erstreckte.

3. Pipettieren der je 100 ml Testseren, die vorher im Kühlschrank langsam aufgetaut wurden.
4. Zu jedem Teströhrchen (Standard- und Test-Prolactin) wurden 300 µl Pufferlösung und 200 µl NIAMD-Anti-Rat Prolactin-S-1 zugegeben. Nach dem Mischen wurden die Röhrcheninhalte 3 Tage lang bei 4^{o} C präinkubiert, um die Empfindlichkeit der Testmethode zu erhöhen.
5. Pipettieren und die Zugabe von 100 µl J^{131} NIAMD-Rat Prolactin-I-1, das vorher so eingestellt wurde, daß ungefähr 2 x 10^{4} cpm in 100 µl Lösung enthalten waren. Der Röhrcheninhalt wurde gut gemischt und 3 Tage bei 4^{o} C inkubiert.
6. Zu jedem Röhrchen wurden 100 µl Anti-Kaninchen-Gammaglobulin zugesetzt und 14 Stunden lang inkubiert.
7. Die Röhrcheninhalte wurden für 30 Min. bei ca. 2000 xg zentrifugiert und der Überstand wurde in ein Becherglas dekantiert. Anschließend wurden die Röhrchen zum Auslaufen senkrecht auf Fließpapier gestellt.
8. Impulsmessung des Präzipitats mit dem Szintillationszähler.
9. Die Standardkurve wurde erstellt und das Ergebnis wurde als ng NIAMD-Rat Prolactin-RP-1 pro ml Serum angegeben.

Zu dieser Bestimmung wurden noch folgende drei Kontrollen zusätzlich mitbestimmt:

1. Als Aktivitätskontrolle des Prolactin-J^{131} wurde zum Röhrchen nur Prolactin-J^{131} und Anti-Gamma-Globulin zugegeben.
2. Als Backgroundkontrolle wurden Röhrchen mit Pufferlösung, Prolactin-J^{131} und Anti-Gamma-Globulin angefertigt. Die Radioaktivität des Präzipitats in dieser Probe bedeutet die unspezifische Bindung von Prolactin-J^{131} bzw. radioaktiven Degradationsprodukten an Proteine im Versuchsansatz.
3. Als Bindungskontrolle wurden Röhrchen ohne unmarkiertes

Prolactin angefertigt.

Außerdem wurden "Recovery"-Studien mit original Humanserum durchgeführt und als Spezifitätsbeweis für diese Bestimmungsmethode der parallele Verlauf der Standardkurve und der "Recovery"-Kurve festgestellt.

2.4. Hypophysengewichte

Durch vorsichtige Präparation der Köpfe wurden Hypophysen gewonnen und die Frischgewichte bestimmt.

2.5. Präparation der Milchdrüsen

Nach der Blutentnahme für die Prolactin-Bestimmung folgte die Abtrennung der Tierhaut samt Milchdrüsen vom übrigen Körper. Von den zwei Milchleisten wurden folgende drei Partien von jedem Tier abpräpariert und weiterbearbeitet:

1. Die abdominal-inguinalen Drüsen links für die "whole-mount"-Präparation;
2. Ein Teil der pektoralen Drüsen links für die Histologie;
3. Die abdominal-inguinalen Drüsen rechts für die Milchdrüsengewichts- und DNS-Bestimmung.

2.5.1. "Whole-mount"-Präparation

Die "whole-mount"-Präparation (LYONS & JOHNSON 1952) ist bei den Spezies mit flachen Milchdrüsen - zum Beispiel hier bei Ratten - eine recht gute Methode, um einen groben morphologischen Überblick zu bekommen. Die Ausdehnung des Gangsystems und die zahlenmäßige Entwicklung der Knospen und Alveolen können leicht betrachtet werden.

T e c h n i k : Ein genügend großes Hautstück des Drüsenbezirks wurde mit dem darunterliegenden Fett- und Bindegewe-

be vom Tierkörper abgetrennt und auf einer Paraffinplatte mit Nadeln fixiert. Die Paraffinplatten wurden für 24 Stunden in BOUIN'schem Gemisch fixiert. Nach mehrtägiger Spülung in 50 %igem Äthylalkohol folgte die Färbung mit Alaun-Carmin-Lösung. Der überflüssige Farbstoff wurde mit 70 %igem Äthanol entfernt. Dann wurde das Präparat in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und zur Aufhellung mehrere Tage in Xylol eingebracht.
Nach dieser Behandlung wurde der Drüsenkörper von der Haut abgezogen und in Eukitt eingebettet. Schließlich wurden einzelne Ausschnitte in 16-facher Vergrößerung fotographisch festgehalten.

Herstellung der Alaun-Carmin-Lösung:
12 g Ammoniakalaun, 300 ml Aqua dest. und 4.5 g Carmin wurden gemischt. Nach 15 Min. Kochen wurde dieses Gemisch filtriert und mit 3 ml Formalin versetzt.

2.5.2. Milchdrüsenhistologie

Die Histologie erlaubte eine Betrachtung von Unterschieden und Veränderungen innerhalb der Gänge und Alveolen und ergänzte die Befunde, die durch die "whole-mount"-Präparation gewonnen wurden.

T e c h n i k : Von der pektoralen Drüse links wurde ein etwa 1 cm^2 großer Bezirk entnommen und in BOUIN'schem Gemisch fixiert. Nach der Einbettung in Paraffin bei 56° C folgte die Anfertigung der Serienschnitte. Das Präparat wurde dann entparaffiniert und anschließend mit Haematoxilin-Eosin gefärbt.

2.5.3. Milchdrüsengewichte

In Bezug auf den Wachstumsgrad ist das Milchdrüsengewicht nicht unbedingt maßgebend. Es ist eher ein Parameter für die

Drüsenfunktion, da das in den Drüsen enthaltene Sekret mitgewogen wird (MUNFORD 1964).

T e c h n i k : Die rechten abdominal-inguinalen Drüsen wurden von Fett- und Bindegewebe befreit und gewogen. Das Präparat wurde für die DNS-Bestimmung weiterverwendet.

2.5.4. DNS-Bestimmung

Durch die DNS-Bestimmung wurden die Befunde der "whole-mount"-Präparation quantitativ ergänzt.
Diese Methode basiert auf folgenden Annahmen:

- Der DNS-Gehalt eines bestimmten Organs ist seiner Zellzahl direkt proportional (KIRKHAM & TURNER 1953; MIRSKY & RIS 1949).
- Der Kollagengehalt einer im Aufbau befindlichen Milchdrüse bleibt fast konstant. Daher ist der Bestimmungsfehler durch Bindegewebszellen in allen Gruppen annähernd gleich groß (HARKNESS & HARKNESS 1956).
- Der DNS-Gehalt der gesamten Milchdrüsen (mg) ist ein Parameter für den Entwicklungszustand; der DNS-Gehalt pro Drüse (mg/g) dagegen ein Maß für die Wachstumsrate. (KIRKHAM & TURNER 1954; MUNFORD 1963; TURNER, WILLIAMS & HINDERY 1963; WILLIAMS & TURNER 1961.)

Damit gibt der DNS-Gehalt pro Drüse eine quantitative Auskunft über den Aufbaugrad der Drüsengänge und Alveolen. Der Nachteil bei dieser Methode ist, daß ein Unterschied im Aufbaugrad von Gängen und Alveolen nicht erfaßt werden kann.

T e c h n i k : (SCHNEIDER 1945; WEBB & LEVY 1955; MOON, GRIFFITH & TURNER 1959; GRIFFITH & TURNER 1961.)
Nach der Wägung wurden die Drüsen für eine Woche bei -30° C tiefgefroren. Durch je 4-stündiges Kochen in 96 %igem Äthanol/Benzol und Äther wurden das Wasser und Fett extrahiert. Das verbleibende Trockenmaterial wurde gewogen (Trok-

kengewicht, sog. DFFT), in einer Mühle pulverisiert und der DNS-Gehalt für das einzelne Tier nach der Methode von WEBB und LEVY bestimmt.

A. DNS-Gewinnung durch Hydrolyse:

1. 15 g des Untersuchungsmaterials wurden in 3 ml 5 %iger Trichloressigsäure (TCA) suspensiert.
2. Die Suspension wurde in Schliffzentrifugengläsern 30 Min. lang in kochendem Wasserbad hydrolisiert.
3. Kühlung der Gläser.
4. Zu dem Ausgangsvolumen von 3 ml wurden zusätzlich 3 ml TCA gegeben.
5. Der Inhalt wurde gemischt und zentrifugiert.

B. Herstellung der DNS-Standardlösung:

1. Für die Herstellung der Stammlösung wurden 25 mg DNS in 20 ml 50 %iger TCA gelöst und 30 Min. lang in kochendem Wasserbad erhitzt.
2. Nach der Abkühlung wurde das Volumen mit 5 %iger TCA auf 25 ml gebracht.
3. Die Stammlösung wurde mit 5 %iger TCA zu verschiedenen Konzentrationen verdünnt.

Durch A und B gewonnene Probe- und Standardlösungen wurden colorimetrisch bestimmt.

C. Colorimetrische Bestimmung:

1. 2 ml des hydrolisierten Materials wurden in Zentrifugengläsern pipettiert.
2. Zu jeder Probe wurden 2 ml TCA und 0.2 ml 0.5 %iges P-Nitrophenylhydrazin (in 96 %igem Alkohol gelöst) zugegeben.
3. Ein Reagenzienleerwert wurde hergestellt, indem 4 ml 5 %ige TCA und 0.2 ml P-Nitrophenylhydrazin verwendet wurden.

4. Alle Proben wurden 20 Min. lang in kochendem Wasserbad erhitzt.
5. Nach Abkühlung wurden 10 ml n-Butylacetat zu jeder Probe gegeben.
6. Die Zentrifugiergläser wurden 15 Min. lang geschüttelt.
7. Zur besseren Trennung der organischen Schicht von der wässrigen Schicht wurden die Proben zentrifugiert.
8. Die größere organische Phase wurde abgesaugt und verworfen.
9. 3 ml der wässrigen Phase wurden zur Messung in Reagenzgläser überführt.
10. 1 ml 2 n-NaOH wurde zur Entwicklung der Farbe dazugegeben.
11. Die gefärbte Lösung wurde mit dem EPPENDORF-Photometer bei 546 nm gemessen.

D. Berechnung:

1. Die Standardkurve wurde erstellt.
2. Mit ihrer Hilfe wurde der DNS-Gehalt der einzelnen Probelösungen ermittelt.
3. Anschließend wurde für jedes Tier der DNS-Gehalt in µg pro Milchdrüsenleiste berechnet.

III. ERGEBNISSE

3.1. Körpergewichte (s. Abb. 6, Tab. 2 und 3)

Die Körpergewichte der Tiere, die mit Steroidhormonen behandelt wurden, waren eindeutig geringer als bei den Kontrolltieren.

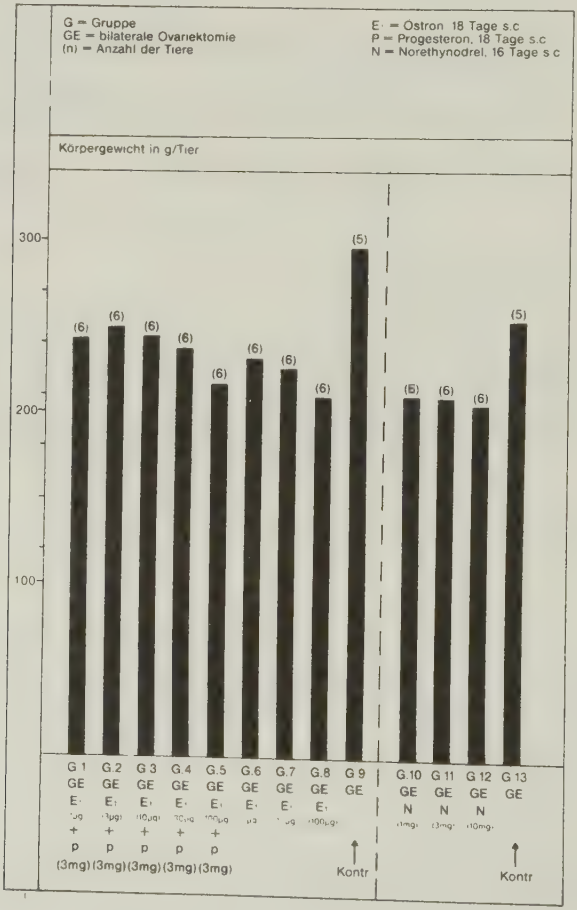


Abb. 6 Körpergewichte (in g/Tier)

Tab. 2

Körpergewichte / U - Test
(S. Anmerkung auf Seite 30, Gruppe I)

Gruppen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		-	10	10	5	10	1	1	-	1	1	1	-
2	8.0		-	-	10	-	1	1	-	1	1	1	-
3	4.0	7.0		-	-	-	-	1	-	5	1	5	-
4	5.0	8.0	17.0		-	-	-	5	-	10	5	10	-
5	3.0	5.0	9.0	11.0		-	-	-	-	-	-	-	10
6	4.0	6.0	13.0	16.5	11.0		-	10	-	-	5	10	-
7	1.0	1.0	8.0	12.0	15.0	13.5		10	-	-	2	10	5
8	0.0	0.0	0.0	5.0	14.5	6.0	5.5		10	-	-	-	1
9	7.0	13.0	17.0	14.0	8.0	12.5	10.5	7.0		10	5	5	-
10	1.0	1.0	4.0	7.0	16.0	8.5	10.0	17.0	6.5		-	-	2
11	0.0	0.0	0.0	4.0	11.0	4.0	2.5	13.0	5.0	14.0		-	1
12	1.0	1.0	4.0	6.0	14.0	7.0	7.0	12.0	4.5	15.0	18.0		2
13	7.0	10.5	15.0	15.0	7.0	10.0	5.0	0.0	18.0	3.0	0.0	3.0	

oben rechts = Testwahrscheinlichkeiten P
unten links = Empirische U-Werte

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
10 = Signifikanz auf dem 10 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
5 = Signifikanz auf dem 5 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
2 = Signifikanz auf dem 2 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
1 = Signifikanz auf dem 1 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
* = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 % - Niveau zu klein

Die mit Norethynodrel behandelten Tiere zeigen alle im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringere Körpergewichte ($P \leqq 0.01$).
Die Tiere der Gruppen 6, 7 und 8, die mit Östron behandelt wurden, weisen auch signifikant geringere Körpergewichte auf als die Kontrolltiere (bei der Gruppe 6: $P \leqq 0.10$; bei den Gruppen 7 und 8: $P \leqq 0.01$).
Die Gruppen 1 (Östron 1 µg + Progesteron 3 mg) und 2 (Östron 3 µg + Progesteron 3 mg) haben im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede, aber die Gruppen 3 und 4 zeigen auf dem 10 % - Niveau, und die Gruppe 5 auf dem 5 % - Niveau, signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe.

Die verminderte Körpergewichtsentwicklung unter Östrogeneinwirkung ist bekannt. Sie beruht auf einer herabgesetzten Futteraufnahme (SOLLMANN 1957).

Tab. 3

Computer Gruppen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Gruppe I	9	13	3	4	5	6	7	8	1	10	11	12	2
Gruppe II	13	9	6	4	5	1	7	8	2	10	11	12	3
Gruppe III	1	7	11	4	5	2	8	10	3	12			

Anmerkung zur Auswertung durch den Computer

Die Gruppeneinteilung durch den Computer ist nicht identisch mit der sonstigen Gruppeneinteilung.

3.2. Serum-Prolactin-Bestimmung (s. Abb. 7, 8, 9 und Tab. 4)

Die Tiere, die mit Östron und Progesteron (3 mg) behandelt wurden, zeigen - bis auf die Gruppe 1 - signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Gruppe 2: $P \leqq 0.10$; sonstige Gruppen: $P \leqq 0.01$).
Gruppe 2 hat einen signifikant erhöhten Wert ($P \leqq 0.02$) im Vergleich zur Gruppe 1.
Die Gruppen 3, 4 und 5 weisen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf, aber im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 signifikant erhöhte Werte ($P \leqq 0.01$).

Bei den mit Östron allein behandelten Tieren zeigt die Kurve mit den erhöhten Östron-Dosen signifikant erhöhte Prolactinwerte.
Gruppe 7 (E_1 10 µg) hat einen signifikant erhöhten Wert ($P \leqq 0.01$) im Vergleich zur Gruppe 6 (E_1 1 µg) und signifikant niedrigeren Wert ($P \leqq 0.02$) im Vergleich zur Gruppe 8 (E_1 100 µg).
Gruppe 6 (E_1 1 µg) weist keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf.

Die Prolactinwerte der Tiere, die mit Norethynodrel behandelt wurden, waren im Vergleich zur Kontrolle erhöht und zeigen mit zunehmenden Steroid-Dosen eine ansteigende Tendenz.
Zwischen den Gruppen 10 und 11 und zwischen den Gruppen 11 und 12 gibt es jeweils keine signifikanten Unterschiede. Gruppe 12 ist im Vergleich zur Gruppe 10 auf dem 10 % - Niveau signifikant erhöht.

Die Gruppe 10 (N 1 mg) weist keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe 7 auf (E_1 10 µg), Gruppe 11 (N 3 mg) keinen zur Gruppe 7 (E_1 10 µg) und Gruppe 12 (N 10 mg) keinen zu den Gruppen 3 (E_1 10 µg + P 3 mg), 5 (E_1 100 µg + P 3 mg) und 7 (E_1 10 µg) auf.

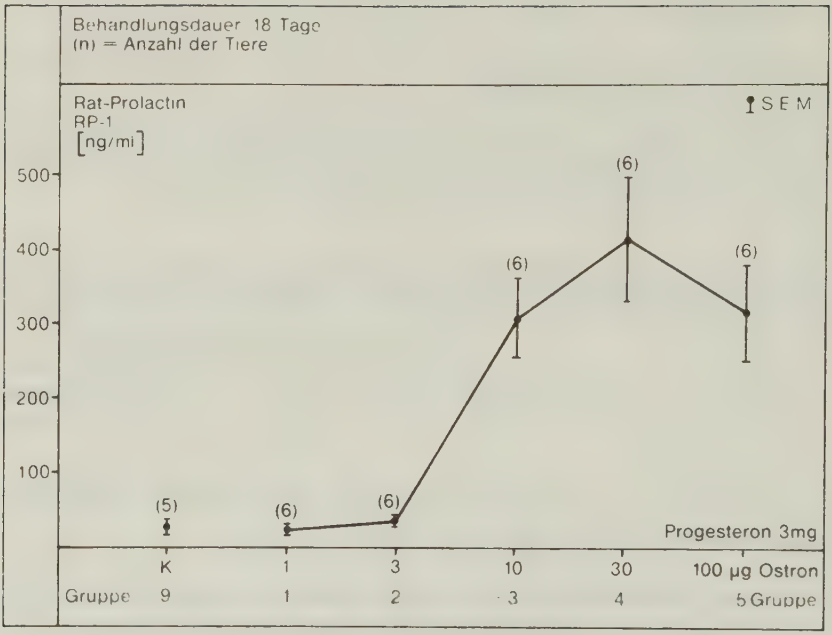


Abb. 7 Beeinflussung des Serumprolactinspiegels durch exogene Zufuhr von Progesteron und Östron bei ovariektomierten Ratten

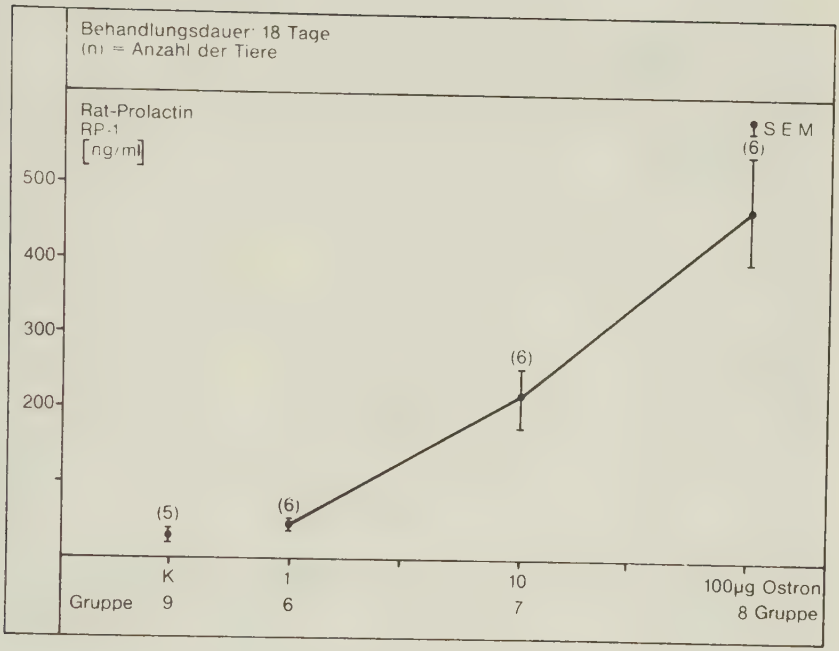


Abb. 8 **Beeinflussung des Serumprolactinspiegels durch exogene Zufuhr von Östron bei ovariektomierten Ratten**

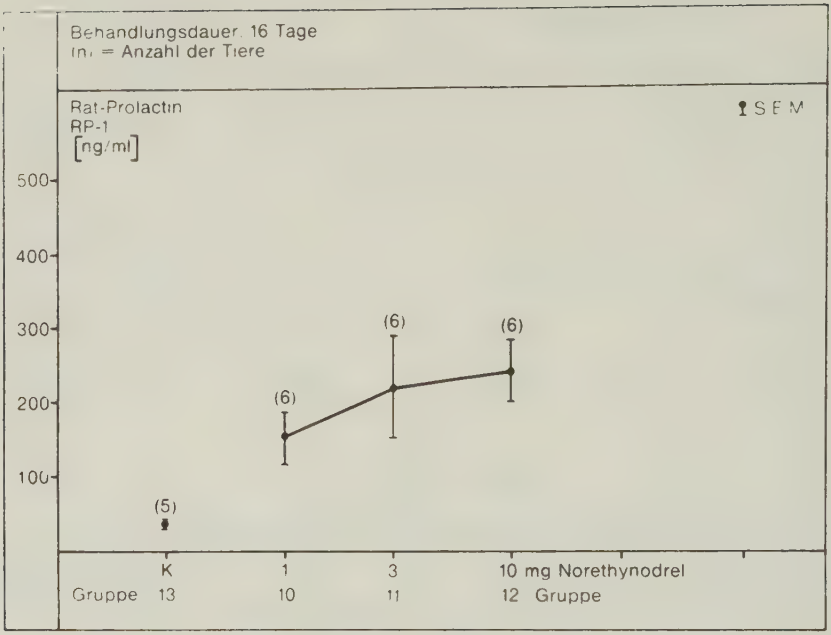


Abb. 9 Beeinflussung des Serumprolactinspiegels durch exogene Zufuhr von Norethynodrel bei ovariektomierten Ratten

Tab. 4

Beeinflussung des Serumprolactinspiegels
durch (exogene) Steroidhormonzufuhr bei ovariektomierten Ratten
U - T e s t
(S. Anmerkung auf Seite 30, Gruppe II)

Gruppen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		-	-	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1
2	3.0		-	1	1	-	1	1	10	1	1	1	1
3	8.0	5.0		1	1	10	1	1	-	1	1	1	1
4	0.0	0.0	0.0		-	1	10	-	1	1	5	10	-
5	0.0	0.0	0.0	11.5		1	-	10	1	10	10	-	-
6	0.0	9.0	4.5	0.0	0.0		1	1	2	1	1	1	1
7	0.0	0.0	0.0	6.0	12.0	0.0		2	1	-	-	-	-
8	0.0	0.0	0.0	14.0	6.5	0.0	2.5		1	1	2	2	10
9	11.0	4.5	15.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0		1	1	1	1
10	0.0	0.0	1.0	2.0	6.0	0.0	7.5	1.0	0.0		-	10	2
11	0.0	0.0	0.0	3.5	5.5	0.0	16.0	3.0	0.0	10.0		-	10
12	0.0	0.0	0.0	7.0	12.0	0.0	15.0	3.0	0.0	5.5	12.5		-
13	0.0	0.0	0.0	12.5	15.5	0.0	9.5	6.0	0.0	2.5	5.5	10.5	

oben rechts = Testwahrscheinlichkeiten P
unten links = Empirische U-Werte

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
10 = Signifikanz auf dem 10 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
5 = Signifikanz auf dem 5 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
2 = Signifikanz auf dem 2 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
1 = Signifikanz auf dem 1 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
* = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 % - Niveau zu klein

3.3. Hypophysengewichte (s. Tab. 5, Abb. 10, Tab. 6)

Die Gruppen 1 (E_1 1 µg + P 3 mg) und 6 (E_1 1 µg) weisen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Sonst haben alle anderen Gruppen - im Vergleich zur Kontrollgruppe - signifikant erhöhte Werte.
Die Kurven zeigen im allgemeinen eine ansteigende Tendenz mit der Zunahme der Östron-Dosis.

Die Werte bei den Gruppen 3, 4 und 5 sind signifikant höher als bei den Gruppen 1 und 2.
Zwischen den Gruppen 1 und 2 gibt es keinen signifikanten Unterschied.
Gruppe 5 hat einen höheren Wert als Gruppe 3 ($P \leqq 0.02$).

Bei den mit Östron allein behandelten Tieren ist die Beziehung zwischen den Hypophysengewichten und der Östron-Dosis am eindeutigsten.
Je höher die Östron-Dosis, desto höher ist auch das Hypophysengewicht.

Bei den Tieren, die mit Norethynodrel behandelt wurden, haben die Gruppen 11 und 12 signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur Gruppe 10 ($P \leqq 0.01$).
Zwischen den Gruppen 11 und 12 existiert aber kein signifikanter Unterschied.

Gruppe 10 weist zu den Gruppen 1, 2 und 6, Gruppe 11 zu den Gruppen 3, 4, 5 und 7 und Gruppe 12 zu den Gruppen 3, 4 und 7 keine signifikanten Unterschiede auf.

Tab. 5 Hypophysengewichte nach (exogener) Sexualhormonzufuhr bei ovariektomierten Ratten

Gruppe		Behandlung	Anzahl Tiere (n)	Körpergewichte (in g) (M+ST-Abw-M)	Hypophysengewichte in mg / Tier	Hypophysengewichte in mg/100 g KG
I	1	GE E_1(1 µg)+P(3 mg)	6	242.7 ± 12.2	13.12 ± 1.21	5.36 ± 0.32
	2	GE E_1(3 µg)+P(3 mg)	6	247.7 ± 6.3	14.63 ± 0.69	5.91 ± 0.25
	3	GE E_1(10 µg)+P(3 mg)	6	244.2 ± 8.1	19.73 ± 1.21	7.64 ± 0.52
	4	GE E_1(30 µg)+P(3 mg)	6	237.3 ± 10.9	21.47 ± 1.96	9.09 ± 0.81
	5	GE E_1(100 µg)+P(3 mg)	6	217.3 ± 11.7	21.07 ± 0.74	9.76 ± 0.33
II	6	GE E_1(1 µg)	6	231.8 ± 9.3	12.70 ± 0.87	5.48 ± 0.30
	7	GE E_1(10 µg)	6	225.5 ± 5.2	18.52 ± 1.43	8.27 ± 0.75
	8	GE E_1(100 µg)	6	209.7 ± 3.7	24.37 ± 1.45	11.67 ± 0.77
Kontr.	9	GE	5	296.4 ± 24.9	13.60 ± 0.65	4.67 ± 0.23
III	10	GE N (1 mg)	6	210.5 ± 9.1	11.25 ± 0.83	5.34 ± 0.30
	11	GE N (3 mg)	6	197.5 ± 10.0	17.23 ± 1.49	8.80 ± 0.75
	12	GE N (10 mg)	6	205.5 ± 8.3	16.93 ± 1.13	8.25 ± 0.51
Kontr.	13	GE	5	254.0 ± 6.4	10.92 ± 1.00	4.30 ± 0.34

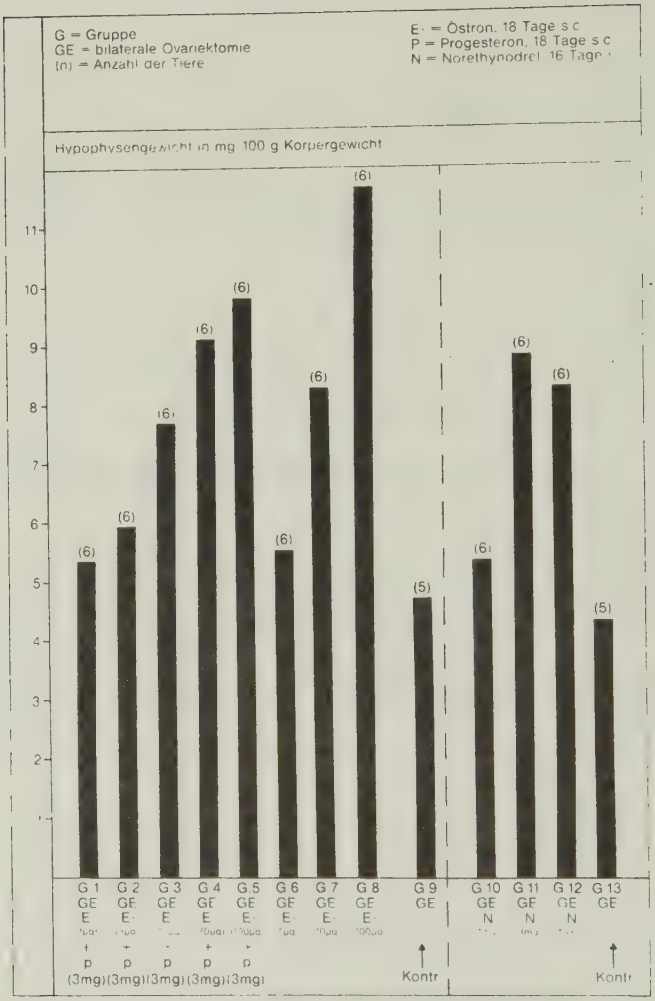


Abb. 10 Hypophysengewichte nach exogener Sexualhormonzufuhr bei ovariektomierten Ratten

Tab. 6

Hypophysengewichte nach (exogener) Sexualhormonzufuhr
bei ovariektomierten Ratten (in mg/100 g KG)
U - T e s t
(S. Anmerkung auf Seite 30, Gruppe I)

Gruppen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		-	1	1	1	-	1	1	-	-	1	1	1
2	7.0		1	1	1	10	1	1	10	10	1	1	1
3	0.0	0.0		-	2	1	-	1	1	1	-	-	1
4	0.0	0.0	8.0		-	1	-	5	1	1	-	-	1
5	0.0	0.0	3.0	18.0		1	-	5	1	1	-	5	1
6	6.0	4.0	0.0	0.0	0.0		1	1	-	-	1	1	-
7	0.0	0.0	15.0	10.0	11.0	2.0		2	2	1	-	-	5
8	0.0	0.0	1.0	4.0	5.0	0.0	3.0		1	1	10	1	1
9	6.0	5.0	0.0	0.0	0.0	16.0	3.0	0.0		-	1	1	-
10	7.5	4.0	2.0	1.0	0.0	16.0	2.0	0.0	18.0		1	1	-
11	0.0	0.0	12.0	16.0	10.5	0.0	17.0	6.0	0.0	0.0		-	1
12	0.0	0.0	11.0	12.0	5.0	0.0	16.5	1.0	0.0	1.0	16.0		1
13	0.0	0.0	2.0	2.0	0.0	14.0	4.0	0.0	11.0	8.0	1.0	1.0	

oben rechts = Testwahrscheinlichkeiten P
unten links = Empirische U-Werte

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
10 = Signifikanz auf dem 10 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
5 = Signifikanz auf dem 5 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
2 = Signifikanz auf dem 2 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
1 = Signifikanz auf dem 1 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
* = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 % - Niveau zu klein

3.4. Präparation der Milchdrüsen

3.4.1. "Whole-mount"-Präparation

Für die Abbildungen wurden aus einzelnen Gruppen jeweils repräsentative Beispiele ausgewählt und 16-fach vergrößert.

Abb. 11 Gruppe 1
Ovariektomie, 1 µg Östron + 3 mg Progesteron

Abb. 11

Das Bild zeigt eine deutliche Stimulierung der Milchdrüsen. Acini und Alveolen gruppieren sich um die Ausführungsgänge, und an der Peripherie sind vermehrt Acini zu Alveolen aufgetrieben. Trotz dieser deutlichen Aktivität des Sekretionsgewebes zeigen die Drüsen eine geringere Ausdehnung und Dichte im Vergleich zur Gruppe 3 (10 µg E_1 + 3 mg P), 4 (30 µg E_1 + 3 mg P) und 5 (100 µg E_1 + 3 mg P).

Abb. 12 Gruppe 2
Ovariektomie, 3 µg Östron + 3 mg Progesteron

Diese Gruppe zeigt ein fast identisches Bild mit der Gruppe 1.

Abb. 12

Man erkennt Acini und Alveolen um die Ausführungsgänge. Als Zeichen der eindeutigen Stimulierung des Sekretionsgewebes sind Alveolen ballonförmig aufgetrieben und offensichtlich mit Sekret gefüllt. Auch hier zeigt der Drüsenkörper eine mäßige Ausdehnung und Dichte.

Abb. 13 Gruppe 3
Ovariektomie, 10 µg Östron + 3 mg Progesteron

Abb. 13

Das Bild zeigt eine starke Stimulierung der Milchdrüse. Die Ausführungsgänge sind von mächtig aufgetriebenen Alveolen traubenförmig umgeben.

Abb. 14 Gruppe 4
Ovariektomie, 30 µg Östron + 3 mg Progesteron

Abb. 14

Hier zeigt das Bild - ähnlich wie Gruppe 3 - ein vollentwikkeltes tubulo-alveoläres Wachstum. Ballonartig aufgetriebene Alveolen lagern dicht aneinander um die Ausführungsgänge.

Abb. 15 Gruppe 5
Ovariektomie, 100 µg Östron + 3 mg Progesteron

Bei dieser Gruppe sieht man ein Bild, das mit denen der Gruppen 3 und 4 nahezu identisch ist.
Dichte, mit Sekret gefüllte Trauben lagern sich um die Ausführungsgänge.

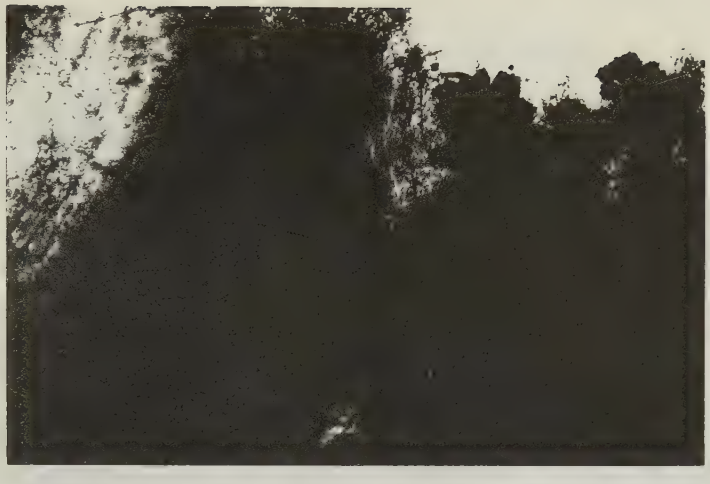


Abb. 15

Abb. 16 Gruppe 6
Ovariektomie, 1 µg Östron

Abb. 16

Das Bild ist ganz anders als bei den Gruppen 1, 2, 3, 4 und 5. Es zeigt eine lockere Verzweigungsstruktur des Gangsystems, die zur Peripherie hin schwächer wird. Im Vergleich zu der

unbehandelten Kontrollgruppe 9 zeigt diese Gruppe eine ganz geringe Stimulierung der Milchdrüse, die in den vereinzelten kleinen End- und Seitenknospen angedeutet wird.

Abb. 17 Gruppe 7
Ovariektomie, 10 µg Östron

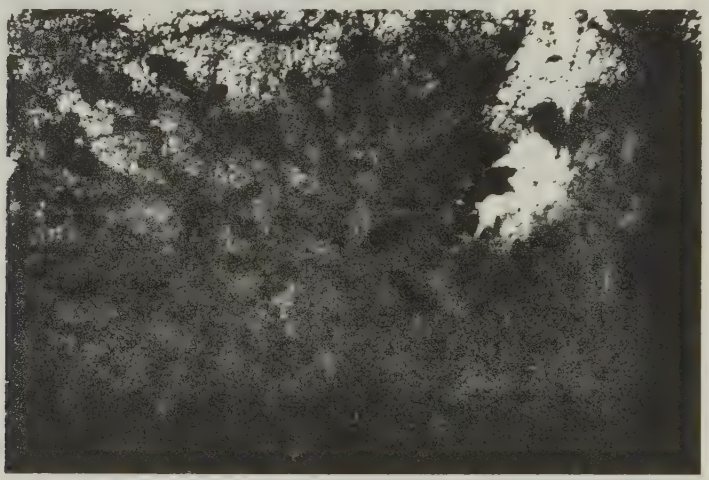


Abb. 17

Bei dieser Gruppe ist der Drüsenkörper viel dichter als bei den Gruppen 6 oder 9, und er zeigt eine recht starke Verzweigungsstruktur als Zeichen einer Stimulierung des Gangsystems. End- und Seitenknospen sind auch gut ausgebildet. Im Vergleich zu den Gruppen, die eine Östrogen/Progesteron-Kombinations-Behandlung erhielten, erkennt man, daß hier keine wesentliche Stimulierung des Sekretionsgewebes stattgefunden hat.

Abb. 18 Gruppe 8
Ovariektomie, 100 µg Östron

Das Bild ist fast identisch mit dem der Gruppe 7. Dichte Verzweigung des Gangsystems und vollentwickelte End- und Seitenknospen deuten eine starke Stimulierung des Gangsystems an,

jedoch zeigt sich keine nennenswerte Alveolenentwicklung.

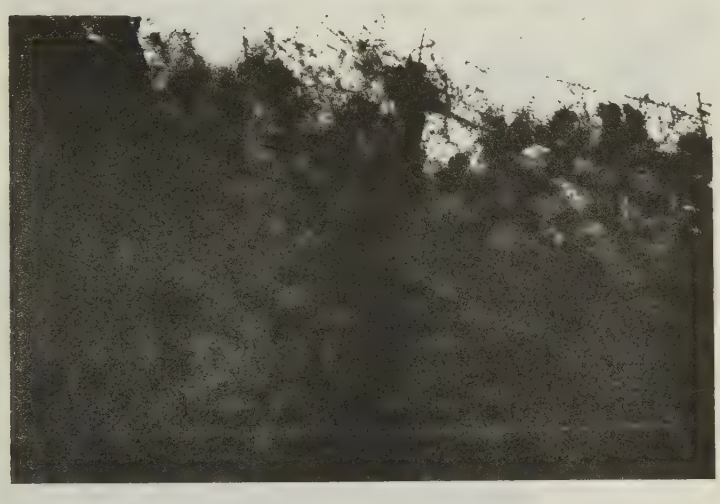


Abb. 18

Abb. 19 Gruppe 9
Ovariektomie, unbehandelt

Abb. 19

Diese Kontrollgruppe wird geprägt durch eine lockere Struktur des Gangsystems, das vorwiegend aus englumigen und verästelten

Gängen besteht. Es sind keine Knospen zu erkennen. Acini und Alveolen sind ebenfalls nicht ausgebildet.

Abb. 20 Gruppe 10
Ovariektomie, 1 mg Norethynodrel

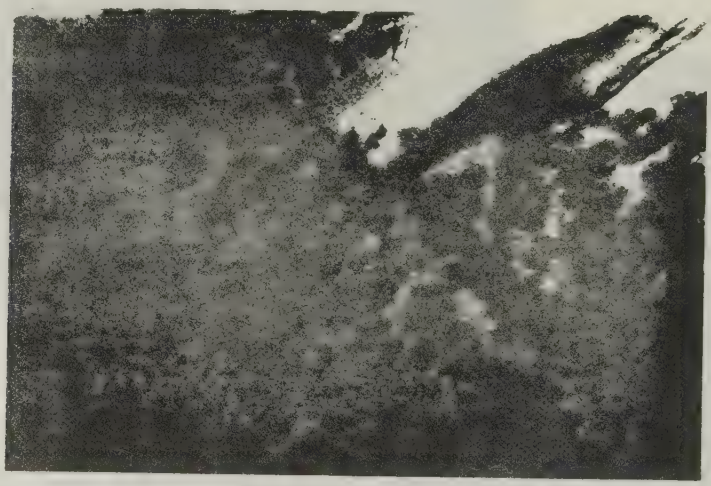


Abb. 20

Hier ähnelt das Bild eher denen der Gruppen, die mit Östrogen allein behandelt wurden, als denen der Gruppen, die eine Östrogen/Progesteron-Kombination erhielten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe 13 ist eine mächtige Lumenvergrößerung des Gangsystems zu erkennen. Die Acini-Bildung ist eindeutig stärker als bei den Gruppen 7 und 8, aber eine dichte mächtige Traubenbildung des Sekretionsgewebes ist noch nicht vorhanden. Vereinzelt sieht man durch Sekret aufgetriebene Alveolen.

Abb. 21 Gruppe 11
Ovariektomie, 3 mg Norethynodrel

Wie bei den Gruppen, die mit Östrogen und Progesteron kombiniert behandelt wurden, zeigen sich hier mächtig ballonförmig aufgetriebene Alveolen, die um die Ausführungsgänge angeordnet sind.

Abb. 21

Abb. 22 Gruppe 12
Ovariektomie, 10 mg Norethynodrel

Abb. 22

Das Bild ist mit dem Bild von Gruppe 11 nahezu identisch. Das tubulo-alveoläre Wachstum ist vollentwickelt. Die um die Ausführungsgänge dicht gelagerten Acini sind durch Sekretfüllung zu Alveolen aufgetrieben.

Abb. 23 Gruppe 13
Ovariektomie, unbehandelt

Abb. 23

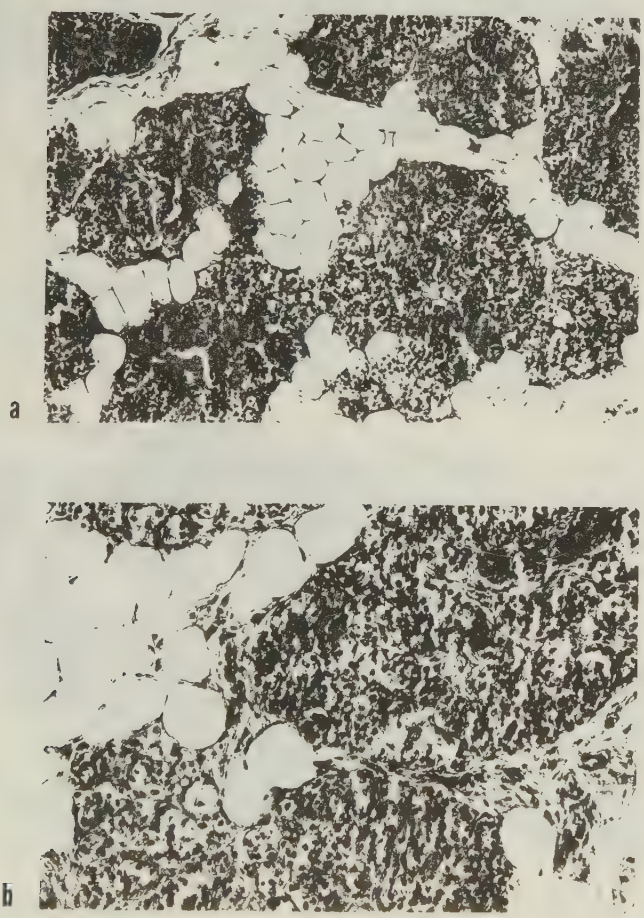
Diese Kontrollgruppe zeigt genauso wie die Gruppe 9 ein locker strukturiertes Gangsystem, das englumig und verästelt ist, jedoch keine Knospenbildung. Acini und Alveolen sind auch nicht vorhanden.

3.4.2. Milchdrüsenhistologie

Hier wurden auch für die Abbildungen aus einzelnen Gruppen jeweils repräsentative Beispiele ausgewählt und 160-fach (Abb. a) und 400-fach (Abb. b) vergrößert.

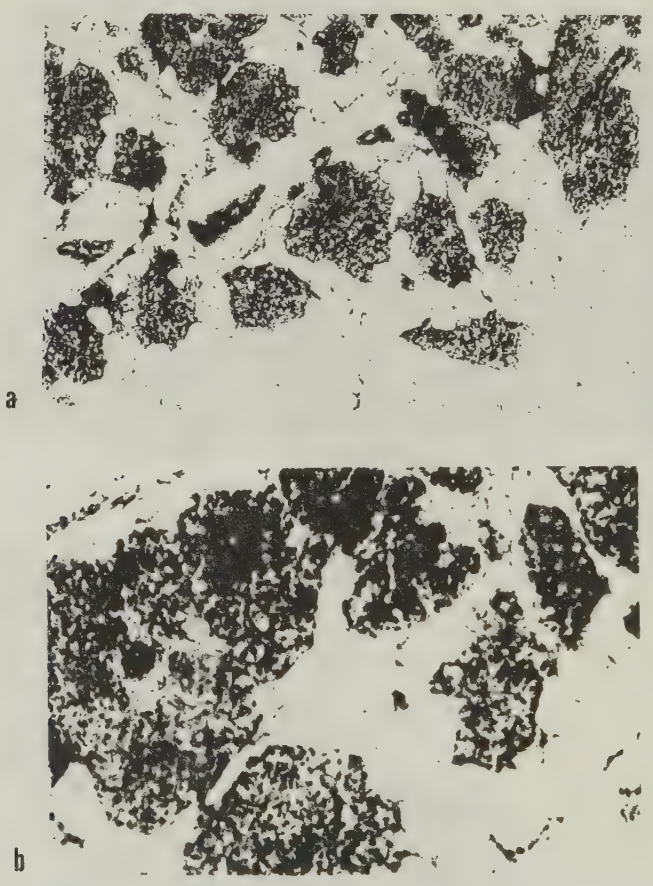
Die histologische Auswertung ermöglicht eine qualitative Aussage im Hinblick auf den Milchdrüsenaufbau einzelner Gruppen. Die Ergebnisse stehen in einer guten Relation zu denen der "whole-mount"-Präparation.

Abb. 24 Gruppe 1
Ovariektomie, 1 µg Östron + 3 mg Progesteron



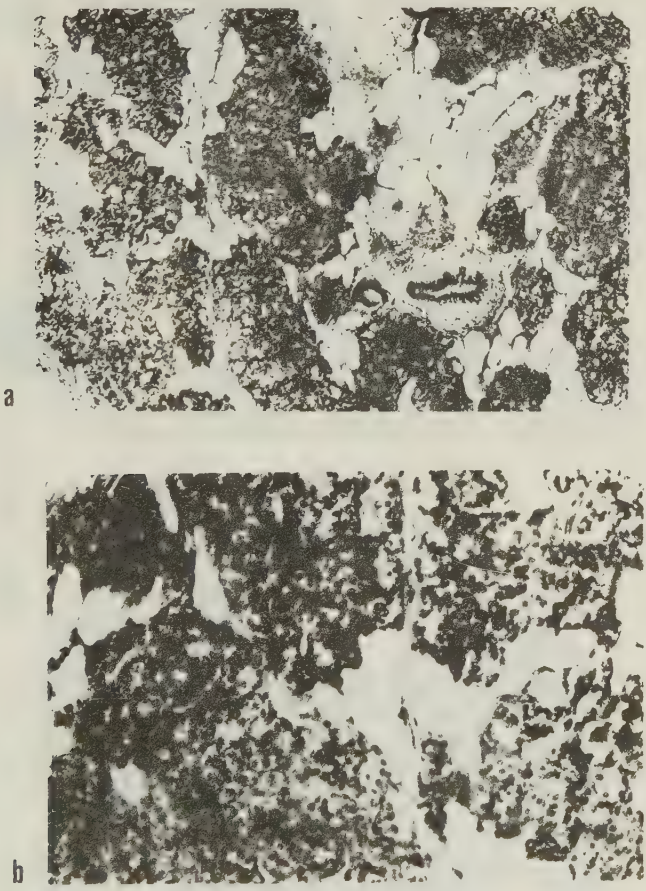
Das histologische Bild wird geprägt von relativ zahlreichen Ducti lactiferi mit etwas weitem Lumen. Mittelgroße Komplexe, vorwiegend geschlossener Alveolen, sind vorhanden. Es zeigen sich keine Zeichen von Sekretion.

Abb. 25 Gruppe 2
Ovariektomie, 3 µg Östron + 3 mg Progesteron



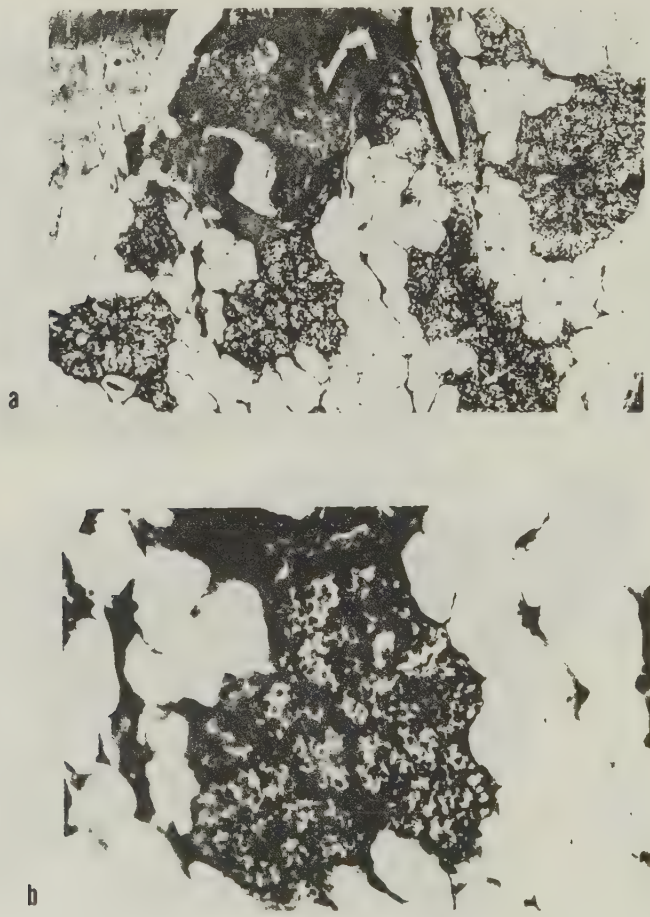
Das Bild ist ähnlich wie bei der Gruppe 1. Die Ducti lactiferi sind mäßig bis zahlreich vorhanden, deren Lumina sind eng bis relativ weit. Die Epithelien sind auch leicht stimuliert und weisen manchmal mehrreihige Anordnung auf. Alveolen sind in mittelgroßen Komplexen zusammengefaßt; ihre Lumina sind geschlossen und enthalten kein Sekret.

Abb. 26 Gruppe 3
Ovariektomie, 10 µg Östron + 3 mg Progesteron



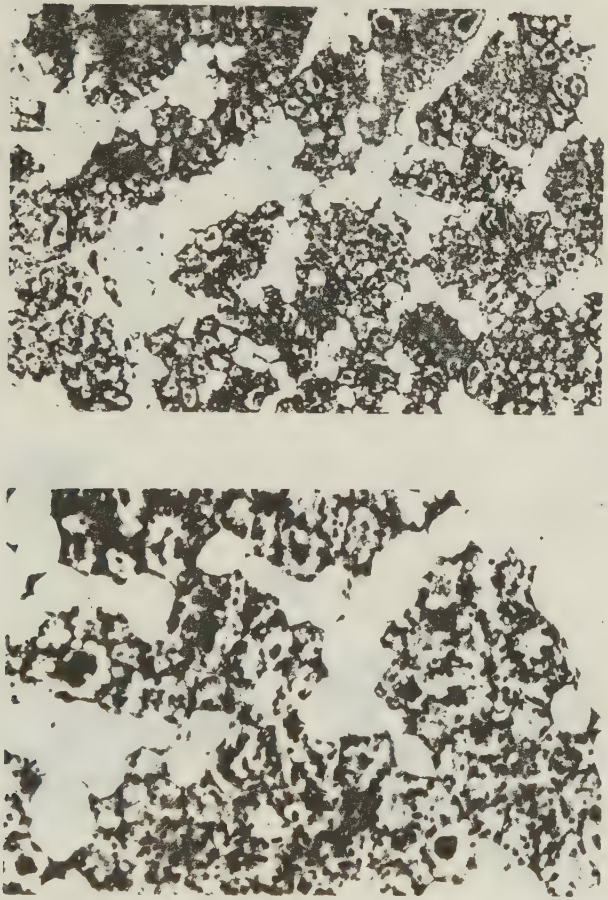
In dieser Gruppe weist das Bild mäßig bis zahlreiche relativ weite Ducti lactiferi auf. Mittelgroße bis große Komplexe der Alveolen, deren Lumina eng bis relativ weit sind, beherrschen das Bild. Relativ viele Alveolen enthalten etwas Sekret.

Abb. 27 Gruppe 4
Ovariektomie, 30 µg Östron + 3 mg Progesteron



Relativ weitlumige Ducti lactiferi sind zahlreich vorhanden. Kleine bis mittelgroße Komplexe vorwiegend geschlossener Alveolen, die kaum Sekret enthalten, sind auch zu erkennen.

Abb. 28 Gruppe 5
Ovariektomie, 100 µg Östron + 3 mg Progesteron

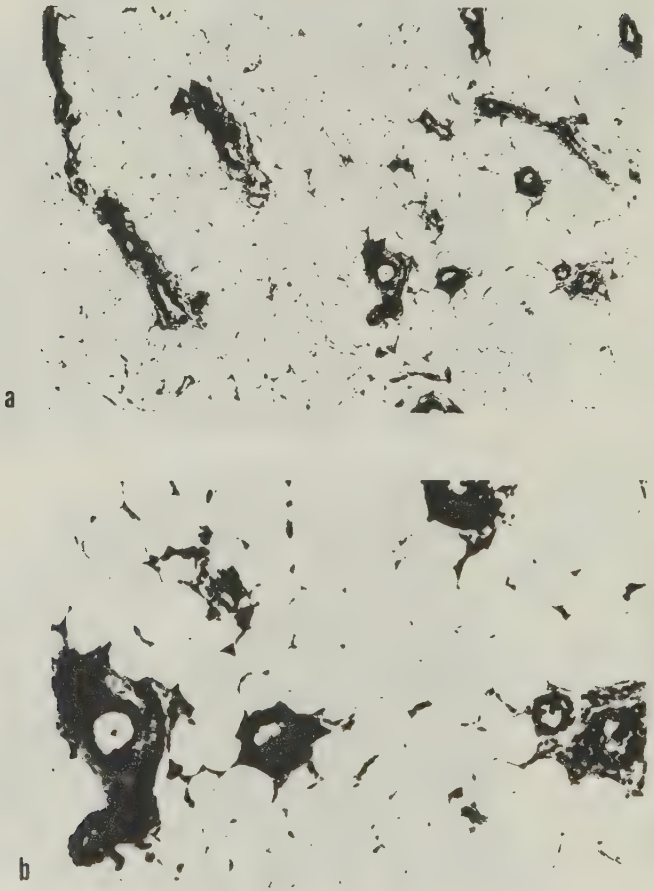


a

b

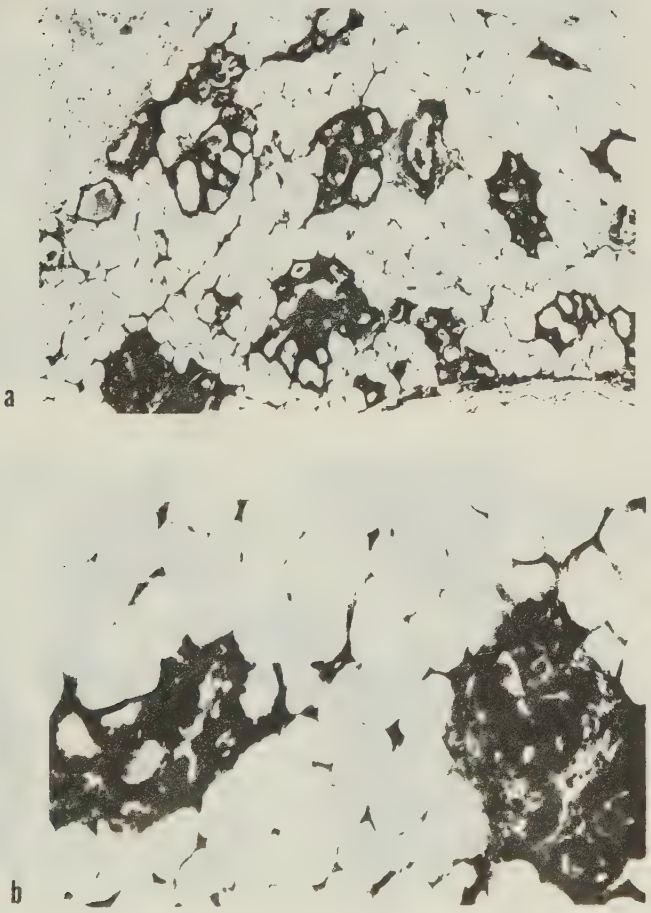
Es sind mäßig bis zahlreiche, relativ weite Ducti lactiferi vorhanden. Mittelgroße Komplexe von mäßig bis sehr weiten Alveolen fallen auf. Manche Alveolen sind reichlich mit Sekret angefüllt.

Abb. 29 Gruppe 6
Ovariektomie, 1 µg Östron



Diese Gruppe zeigt ein ganz anderes Bild als die Gruppen 1 bis 5. Hier sind keine Alveolen zu sehen und relativ weite Ducti lactiferi mit zahlreichen Seitensprossen beherrschen allein das Bild.

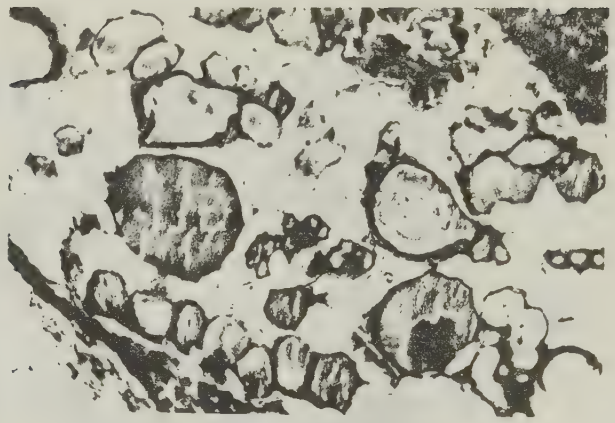
Abb. 30 Gruppe 7
Ovariektomie, 10 µg Östron



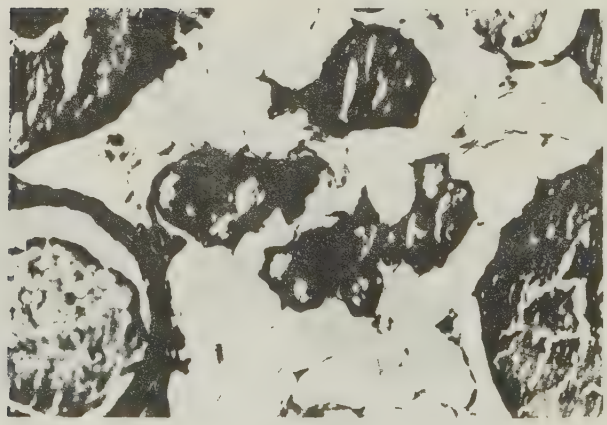
Ducti lactiferi sind relativ weit bis weit und zahlreich vorhanden. Kleine Komplexe der Alveolen sind auch zu sehen. Manche Alveolen besitzen weite Lumen und viel Sekret.

Abb. 31 Gruppe 8
Ovariektomie, 100 µg Östron

a

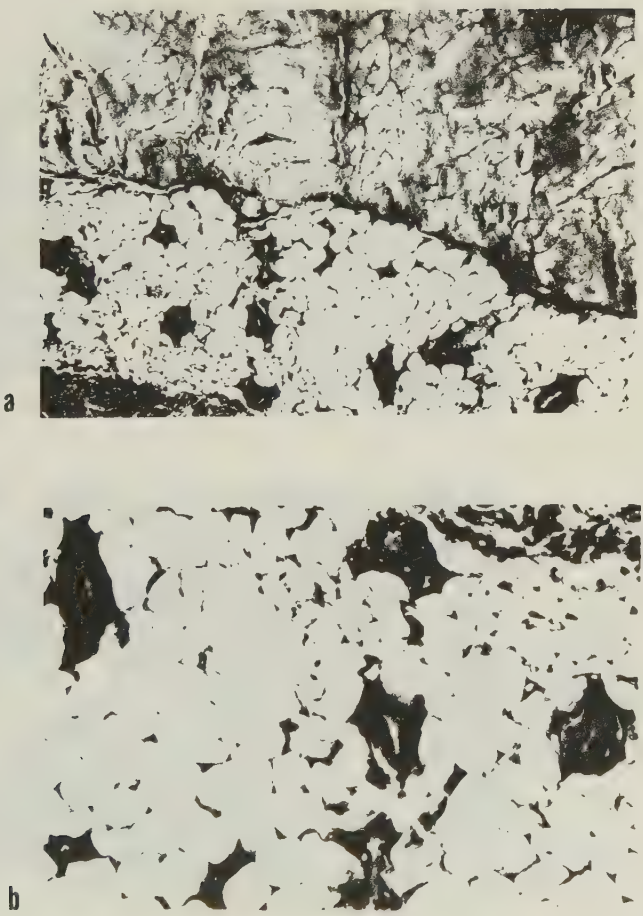


b



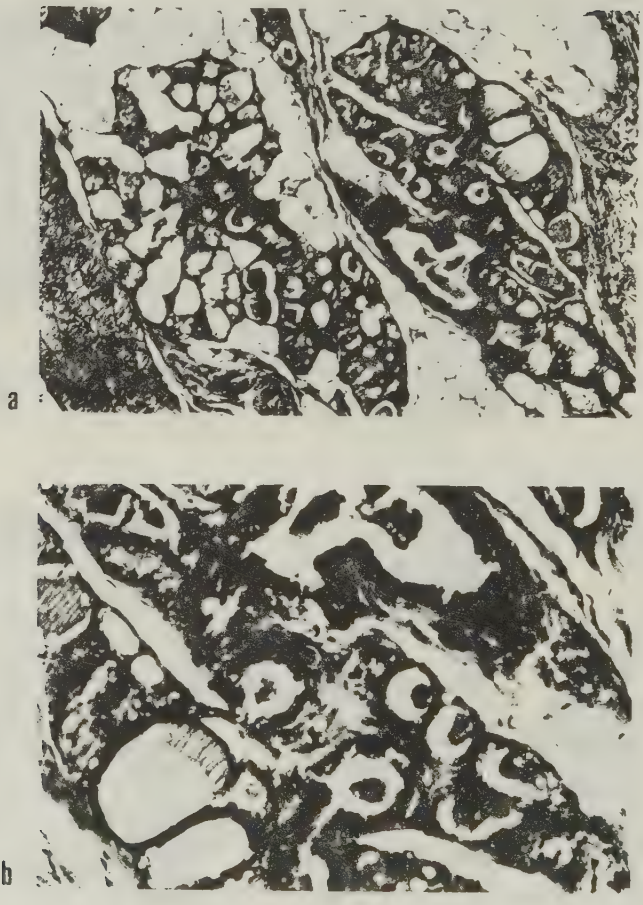
Hier sind auch zahlreiche Ducti lactiferi mit weitem Lumina zu sehen. Kleine Komplexe der Alveolen, deren Lumen relativ weit ist und Sekret enthält, sind auch vereinzelt zu sehen.

Abb. 32 Gruppe 9
Ovariektomie, unbehandelt



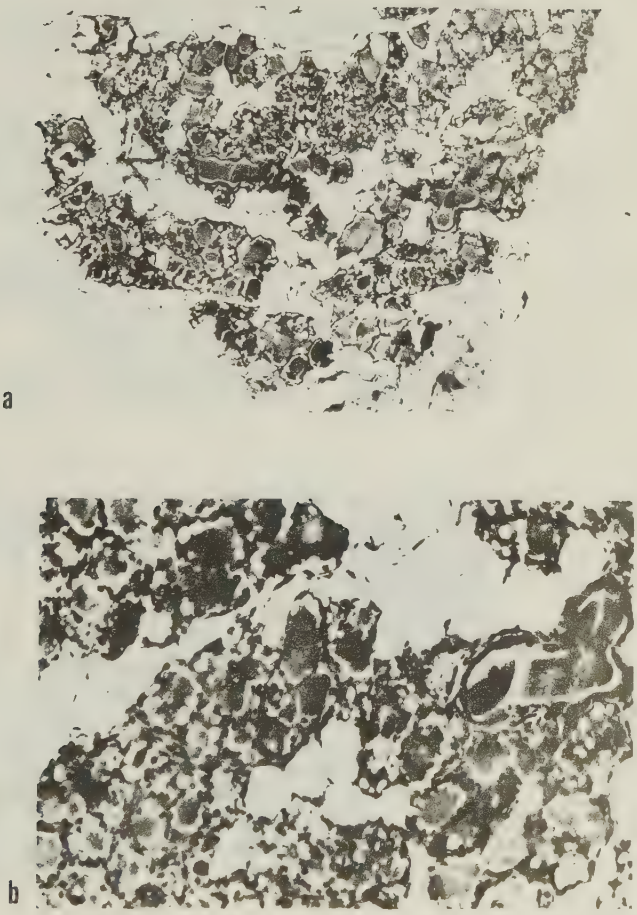
Das Bild ist ähnlich dem der Gruppe 6. Zahlreiche Ducti lactiferi mit relativ weitem Lumen sind zu erkennen. Alveolen sind nicht ausgebildet.

Abb. 33 Gruppe 10
Ovariektomie, 1 mg Norethynodrel



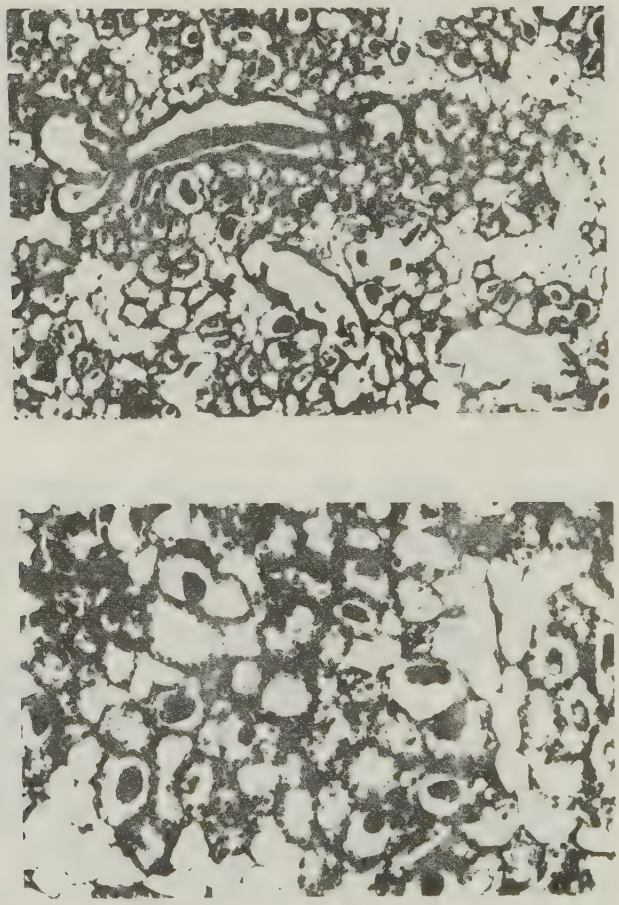
Hier sind wieder kleine Komplexe der relativ weit bis weiten Alveolen zu erkennen. Manche Lumina sind mit Sekret angefüllt. Mäßig bis zahlreiche, relativ weite Ducti lactiferi sind auch vorhanden.

Abb. 34 Gruppe 11
Ovariektomie, 3 mg Norethynodrel



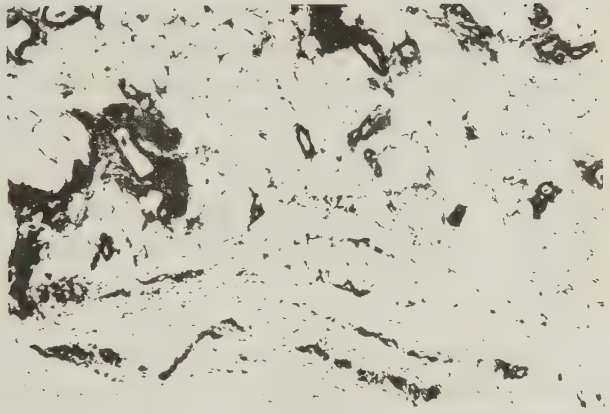
Weitlumige Ducti lactiferi sind mäßig entwickelt. Mittelgroße bis große Komplexe weit bis sehr weit lumiger Alveolen sind vorhanden. Sie sind mit Sekret angefüllt.

Abb. 35 Gruppe 12
Ovariektomie, 10 mg Norethynodrel

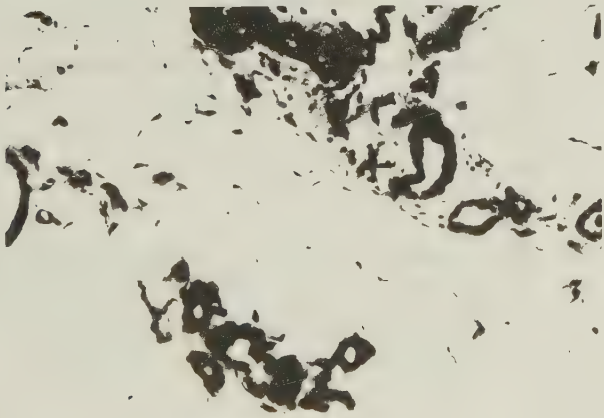


Das Bild ist ähnlich wie bei der Gruppe 11. Mäßig bis zahlreiche weitlumige Ducti lactiferi und große Komplexe weitlumiger Alveolen sind zu sehen. Die Alveolen enthalten sehr viel Sekret.

Abb. 36 Gruppe 13
Ovariektomie, umbehandelt



a



b

Dieser Ausschnitt enthält genauso wie bei der anderen Kontrolle (Gruppe 9) keine Alveolenkomplexe. Zahlreiche eng bis relativ weite Ducti lactiferi sind im Fettgewebe eingebettet zu erkennen.

3.4.3. Milchdrüsengewicht (s. Tab. 7, Abb. 37, Tab. 8, Abb. 38)

Bei der Gruppe 6 (1 µg Östron) und den Kontrollgruppen 9 und 13 war eine Abtrennung der Drüse vom Tierkörper nicht möglich, da das Drüsengewebe zu schwach entwickelt war. Daher stellen bei der Bewertung des Drüsengewichtes und DNS-Gehaltes diese Gruppen praktisch sogenannte "Nullwerte" dar.

Die graphischen Darstellungen des Feuchtgewichtes (mg/Drüse) und der DFFT (dry fat free tissue) zeigen ein sehr ähnliches Bild.

Die Behandlung mit 1 µg Östron wirkt auf die Milchdrüse kaum stimulierend. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen. Bei allen anderen Gruppen sind die Werte - im Vergleich zur Kontrolle - signifikant erhöht.
Bei den Tieren, die mit Östron/Progesteron-Gemisch behandelt wurden, weisen die Gruppe 1 (1 µg Östron + 3 mg Progesteron) und Gruppe 2 (3 µg Östron + 3 mg Progesteron) keine signifikanten Unterschiede zueinander auf.
Die Werte in den Gruppen 3, 4 und 5 sind signifikant höher als in den Gruppen 1 und 2.

Bei den Tieren, die nur mit Östron behandelt wurden, zeigen die Gruppen 7 und 8 signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur Gruppe 6, aber sie sind untereinander nicht signifikant unterschiedlich.

Die Gruppen 10, 11 und 12 unterscheiden sich untereinander nicht signifikant.
Die Werte von Gruppe 10 unterscheiden sich von denen der Gruppen 1, 2, 7 und 8 nicht signifikant bzw. die von Gruppe 11 zu denen der Gruppen 1, 2, 4, 5 und 7 und die von Gruppe 12 zu denen der Gruppen 1, 2 und 7.

Tab. 7

Milchdrüsengewichte

nach der Behandlung mit Sexualhormonen bei ovariektomierten Ratten

Gruppe		Behandlung	Anzahl Tiere (n)	Körpergewichte (in g) (M ± S.E.M.)	Feuchtgewichte (in mg/Drüsen)	Trockengewichte (in mg/Drüsen) DFFT
I	1	GE E_1(1 µg)+P(3 mg)	6	242.7 ± 12.2	1.168 ± 0.101	119.6 ± 8.4
	2	GE E_1(3 µg)+P(3 mg)	6	247.7 ± 6.3	1.345 ± 0.214	118.3 ± 18.5
	3	GE E_1(10 µg)+P(3 mg)	6	244.2 ± 8.1	2.334 ± 0.136	231.2 ± 12.2
	4	GE E_1(30 µg)+P(3 mg)	6	237.3 ± 10.9	2.146 ± 0.188	217.5 ± 21.8
	5	GE E_1(100 µg)+P(3 mg)	6	217.3 ± 11.7	1.801 ± 0.160	188.2 ± 11.1
II	6	GE E_1(1 µg)	6	231.8 ± 9.3	-	-
	7	GE E_1(10 µg)	6	225.5 ± 5.2	1.130 ± 0.066	103.4 ± 11.4
	8	GE E_1(100 µg)	6	209.7 ± 3.7	0.831 ± 0.117	81.8 ± 9.1
Kontr.	9	GE	5	296.4 ± 24.9	-	-
III	10	GE N (1 mg)	6	210.5 ± 9.1	1.084 ± 0.198	117.5 ± 18.4
	11	GE N (3 mg)	6	197.5 ± 10.0	1.421 ± 0.251	154.2 ± 16.6
	12	GE N (10 mg)	6	205.5 ± 8.3	1.156 ± 0.088	147.0 ± 8.7
Kontr.	13	GE	5	254.0 ± 6.4	-	-

GE = Ovariektomie
E_1 = Östron
P = Progesteron
N = Norethynodrel
DFFT = Dry fat free tissue

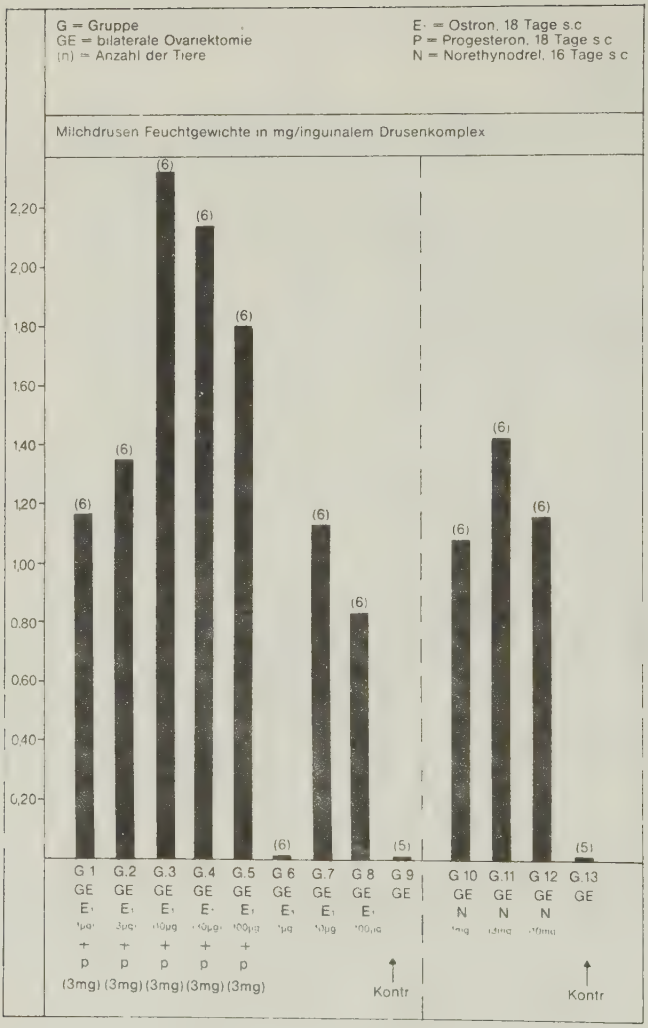


Abb. 37 Milchdrüsenfeuchtgewichte nach der Behandlung mit Sexualhormonen bei ovariektomierten Ratten

Tab. 8

Milchdrüsenfeuchtgewichte nach der Behandlung mit Sexualhormonen bei ovariektomierten Ratten
U - T e s t
(S. Anmerkung auf Seite 30, Gruppe III)

Gruppen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		-	-	1	2	-	10	-	1	-
2	11.0		-	1	1	-	-	-	1	-
3	9.0	8.0		-	-	-	5	-	10	-
4	0.0	0.0	6.0		-	5	1	2	-	1
5	2.0	1.0	8.0	9.0		10	1	5	5	1
6	14.0	8.0	14.0	4.0	7.0		10	-	2	-
7	5.0	6.0	3.0	0.0	0.0	6.0		-	1	10
8	15.0	15.0	11.5	3.0	5.0	14.0	12.0		1	-
9	0.0	0.0	4.0	15.0	4.0	3.0	0.0	0.0		1
10	14.0	14.0	10.0	1.0	2.0	14.0	6.0	17.0	0.0	

oben rechts = Testwahrscheinlichkeiten P
unten links = Empirische U-Werte

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
10 = Signifikanz auf dem 10 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
5 = Signifikanz auf dem 5 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
2 = Signifikanz auf dem 2 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
1 = Signifikanz auf dem 1 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
* = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 % - Niveau zu klein

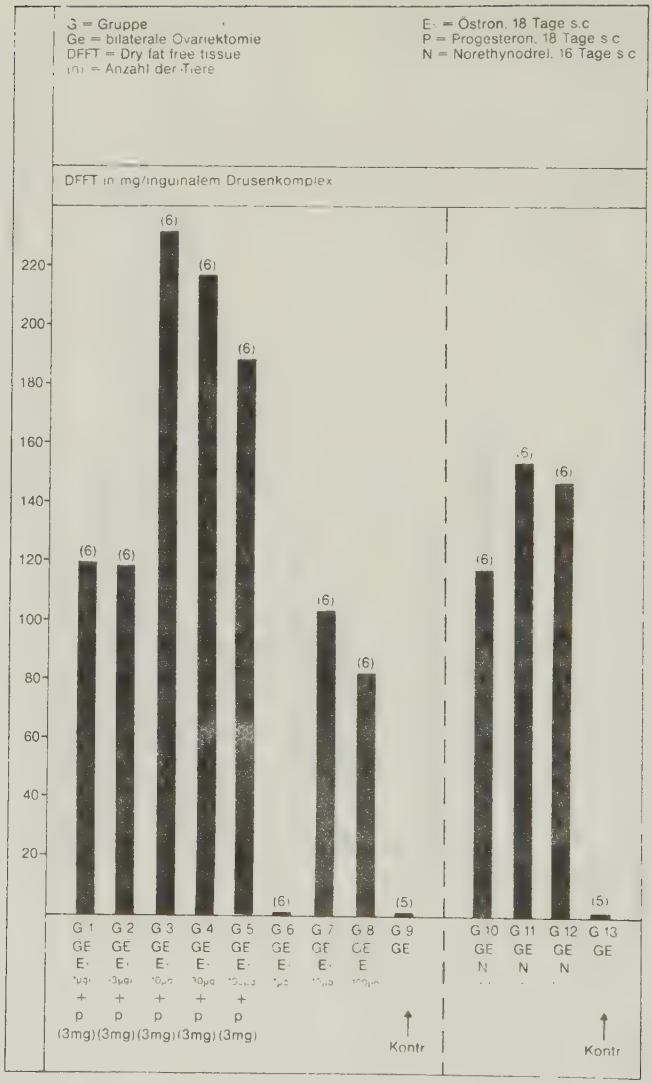


Abb. 38 DFFT (dry fat free tissue) nach der Behandlung mit Sexualhormonen bei ovariektomierten Ratten

3.4.4. DNS - Bestimmung (s. Tab. 9, Abb. 39, Tab. 10)

Der Kurvenverlauf ist fast identisch mit dem der Milchdrüsengewichte.

Bei den mit Östron/Progesteron-Gemisch behandelten Gruppen unterscheiden sich die Gruppen 3, 4 und 5 untereinander nicht signifikant, wohl aber gegenüber den Gruppen 1 und 2. Zwischen den Gruppen 1 und 2 existiert kein signifikanter Unterschied.

Die Gruppe 7 (Östron 10 µg) und die Gruppe 8 (Östron 100 µg) zeigen signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur Gruppe 6 (Östron 1 µg), aber haben untereinander keinen signifikant unterschiedlichen Wert.

Auch zwischen den Gruppen 10, 11 und 12 existieren keine signifikanten Unterschiede.

Die Gruppe 10 (Norethynodrel 1 mg) zeigt zu den Gruppen 1, 2 und 7, die Gruppe 11 (Norethynodrel 3 mg) zu den Gruppen 1, 2, 4 und 5 und die Gruppe 12 (Norethynodrel 10 mg) zu den Gruppen 1, 2 und 5 jeweils keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 9

Beeinflussung des Milchdrüsen-DNS-Gehaltes
durch (exogene) Sexualhormonzufuhr bei ovariektomierten Ratten

Gruppe		Behandlung	Anzahl Tiere (n)	Körpergewichte (in g) (M ± S.E.M.)	DNS (in µg/Drüsen)
I	1	GE E_1(1 µg)+P(3 mg)	6	242.7 ± 12.2	2032.4 ± 258.0
	2	GE E_1(3 µg)+P(3 mg)	6	247.7 ± 6.3	1465.6 ± 281.8
	3	GE E_1(10 µg)+P(3 mg)	6	244.2 ± 8.1	3625.1 ± 286.3
	4	GE E_1(30 µg)+P(3 mg)	6	237.3 ± 10.9	2971.4 ± 328.5
	5	GE E_1(100 µg)+P(3 mg)	6	217.3 ± 11.7	2842.4 ± 335.8
II	6	GE E_1(1 µg)	6	231.8 ± 9.3	-
	7	GE E_1(10 µg)	6	225.5 ± 5.2	1176.4 ± 147.3
	8	GE E_1(100µg)	6	209.7 ± 3.7	1016.9 ± 95.5
Kontr.	9	GE	5	296.4 ± 24.9	-
III	10	GE N (1 mg)	6	210.5 ± 9.1	1537.0 ± 220.7
	11	GE N (3 mg)	6	197.5 ± 10.0	2086.6 ± 189.3
	12	GE N (10 mg)	6	205.5 ± 8.3	2117.3 ± 114.6
Kontr.	13	GE	5	254.0 ± 6.4	-

GE = Ovariektomie
E_1 = Östron, 18 Tage s.c.
P = Progesteron, 18 Tage s.c.
N = Norethynodrel, 16 Tage s.c.

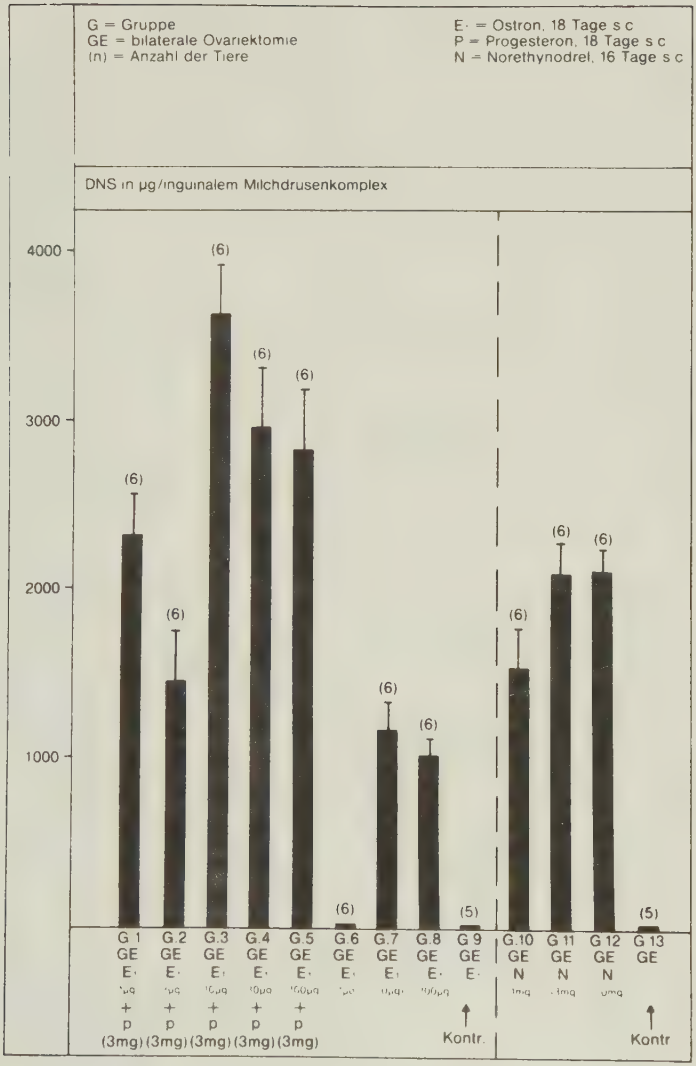


Abb. 39 Beeinflussung des Milchdrüsen-DNS-Gehaltes durch exogene Sexualhormonzufuhr bei ovariektomierten Ratten

Tab. 10

Beeinflussung des Milchdrüsen-DNS-Gehaltes
durch (exogene) Sexualhormonzufuhr bei ovariektomierten Ratten
U - T e s t
(S. Anmerkung auf Seite 30, Gruppe III)

Gruppen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		5	-	10	10	-	1	-	1	-
2	2.0		2	1	1	-	-	-	1	1
3	11.0	1.0		-	-	-	1	10	1	-
4	5.0	1.0	6.0		-	1	1	2	-	10
5	5.0	0.0	7.0	17.0		5	1	1	-	-
6	8.0	11.0	6.0	2.0	4.0		-	-	1	-
7	0.0	12.0	0.0	0.0	0.0	12.0		10	1	1
8	8.0	9.0	5.0	3.0	2.0	17.0	7.0		1	-
9	1.0	0.0	1.0	8.0	9.0	0.0	0.0	0.0		1
10	11.0	0.0	15.0	7.0	8.0	8.0	0.0	8.0	1.0	

oben rechts = Testwahrscheinlichkeiten P
unten links = Empirische U-Werte

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
10 = Signifikanz auf dem 10 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
5 = Signifikanz auf dem 5 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
2 = Signifikanz auf dem 2 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
1 = Signifikanz auf dem 1 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
* = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 % - Niveau zu klein

IV. D I S K U S S I O N

Wie in der Einleitung dargestellt, gelingt es bei Ratten nicht - gleiches gilt für die meisten anderen Spezies - in Abwesenheit der Hypophyse mit Östrogenen und Progesteron oder Östrogen/Progesteron-Kombinationen das tubulo-alveoläre Wachstum der Milchdrüse zu stimulieren. Für einen vollständigen Aufbau der Milchdrüse ist Prolactin essentiell (LYONS & PENCHARZ 1936; GOMEZ & TURNER 1937; NATHANSON, SHAW & FRANSEEN 1939; REECE & LEONARD 1941; GARDNER & WHITE 1941; SAMUELS, REINECKE & PETERSEN 1941; LEONARD & REECE 1942; GOMEZ 1942; LYONS, SIMPSON & EVANS 1943; MIXNER & TURNER 1943; REECE & LEATHEM 1945; FOLLEY 1947a, 1947b, 1952; LYONS, LI, COLE & JOHNSON 1953; FERGUSON 1956; FLUX 1958; LYONS, LI & JOHNSON 1958; HARDFIELD & YOUNG 1958; COWIE & LYONS 1959; COWIE, TINDALL & YOKOYAMA 1966).

Östrogene stimulieren bei Ratten via Hemmung des PIF (MEITES & TURNER 1942; EVERETT 1956, 1964; KANEMATSU & SAWYER 1963; WOLTHUIS & DE JONGH 1963; RATNER, TALWALKER & MEITES 1963; WOLTHUIS 1963b; BEN-DAVID, DIKSTEIN & SULMAN 1964; RATNER & MEITES 1964; TALWALKER, MEITES & MIZUNO 1964; RAMIREZ & MC CANN 1964; NICOLL & MEITES 1962; MEITES & NICOLL 1966; TUCKER, PAAPE & SINHA 1967; CHOWERS & MC CANN 1967; SAR & MEITES 1967; MINAGUCHI, CLEMENS & MEITES 1968) und durch direkte Wirkung auf die Hypophyse (NICOLL & MEITES 1962, 1964; KANEMATSU & SAWYER 1963; MEITES & NICOLL 1965; CHEN, AMENOMORI, VOOGT & MEITES 1970) die Prolaktinsekretion. Da Prolaktin bei dieser Spezies das luteotrope Hormon ist (NEUMANN & ELGER 1970), unterbleibt die Rückbildung der Corpora lutea, und damit bleibt die Progesteronquelle erhalten.
Wenn nicht kastrierte Ratten mit einem Östrogen behandelt werden, so gelangen letztlich - bedingt durch diese besonderen Regelmechanismen bei dieser Spezies - auch Prolaktin und Progesteron zur Wirkung.
Es sei darauf hingewiesen, daß Prolaktin bei Primaten und bei der Frau nicht luteotrop wirkt.

Ziel der Untersuchung war es, quantitative Aussagen speziell zum Prolactin-Progesteron-Synergismus hinsichtlich der Milchdrüsenstimulierung zu erhalten. Aus den oben genannten Gründen wurde in diesen Untersuchungen mit kastrierten Tieren gearbeitet, um das endogene Progesteron auszuschalten.
Im einzelnen wurden folgende Parameter herangezogen: Prolactinserumspiegel, Gewichte der Milchdrüsen, Gehalt der Milchdrüsen an Desoxyribonucleinsäuren (DNS) sowie die Milchdrüsenhistologie und die "whole-mount"-Präparation der Milchdrüsen. Die Hypophysengewichte sollten zusätzlich Hinweise darauf geben, ob - bedingt durch den positiven Rückkopplungsmechanismus - zwischen Östrogenen und der Prolactinsekretion eine Vermehrung und Aktivierung der prolactin-sezernierenden Zellen vorliegt.

Gut überein stimmen die Ergebnisse der "whole-mount"-Präparation der Milchdrüsenhistologie und der DFFT (dry fat free tissue) mit den Werten der DNS-Bestimmung. Bei den Versuchsgruppen, die erhöhte Serumprolactinwerte aufwiesen, waren auch die Hypophysengewichte erhöht. Keine Korrelationen bestanden überraschenderweise zwischen dem tubulo-alveolären Wachstum der Milchdrüse und den Serumprolactinwerten. Die Serumprolactinkonzentrationen lagen bei Gabe von 1.0 µg Östron noch im Kontrollbereich, erst bei Verabfolgung von täglich 10 µg Östron führten sie zu einer hochsignifikanten Erhöhung der Prolactinwerte, und erst bei dieser Dosis war eine Stimulierung des tubulo-alveolären Milchdrüsenwachstums erkennbar. Auch bei Gabe von 1.0 oder 3.0 µg Östron in Kombination mit 3.0 mg Progesteron lagen die Serumprolactinspiegel noch im Kontrollbereich, allerdings war bei beiden Kombinationen das tubulo-alveoläre Milchdrüsenwachstum bereits stark stimuliert. Dieser Befund erlaubt zwei wichtige Aussagen zum Prolactin-Progesteron-Synergismus:

1. Östrogene (Östron) haben nur in Dosen einen stimulierenden Effekt auf das tubulo-alveoläre Milchdrüsenwachstum, die auch die Prolactinsekretion stimulieren. Damit stellt sich

die Frage, ob Östrogene überhaupt einen direkten Effekt auf das tubulo-alveoläre Milchdrüsenwachstum der Ratte haben - abgesehen von einer Stimulation des Gangwachstums - oder ob alle Östrogeneffekte letztlich nur via Stimulation der Prolactinsekretion zustande kommen. Daß Prolactin in unphysiologisch hohen Dosen allein tubulo-alveoläres Wachstum der Milchdrüse zu induzieren vermag, ist bekannt (LYONS, LI & JOHNSON 1953; MIZUNO, IIDA & NAITO 1955; MIZUNO & NAITO 1956; FERGUSON 1956; HARDFIELD & YOUNG 1958).

2. Es könnte sein, daß das tubulo-alveoläre Milchdrüsenwachstum der Ratte nur vom Zusammenwirken von Prolactin und Progesteron abhängig ist. Offensichtlich ist dabei nur ein Mindesthormonblutspiegel an Prolactin erforderlich. Offen bleiben muß natürlich die Frage, ob Progesteron die Wirkung des Prolactins verstärkt oder umgekehrt. Ersteres ist wahrscheinlicher.
Ungeklärt ist auch, wie im einzelnen dieser Synergismus an der Milchdrüse selbst abläuft.

Die zweite Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, zu untersuchen, wie sich die Gabe eines synthetischen Gestagens mit ausgeprägter östrogener Partialwirkung auf das tubulo-alveoläre Milchdrüsenwachstum auswirkt. Ein solches Gestagen ist Norethynodrel.
Die östrogene Partialwirkung des Norethinodrels war auch in den hier durchgeführten Untersuchungen deutlich erkennbar. Die Milchdrüsenbefunde bei Behandlung mit 1 mg Norethinodrel waren ähnlich wie bei der Behandlung mit 10 oder 100 µg Östron. Die Gabe höherer Dosen (3 und 10 mg) wirkte sich ähnlich aus wie die Behandlung mit einer Östrogen/Progesteron-Kombination. Die Tiere zeigten ein ausgeprägtes tubulo-alveoläres Wachstum. Die östrogene Partialwirkung war auch ablesbar an der Erhöhung der Serumprolactinspiegel.

Ratten gehören zu den Spezies, bei denen physiologischerweise

Östrogene und Progesteron etwa im Verhältnis von 1:10 bis 1:20.000 wirken (YOCHIM & DE FEO 1962). Das Östrogen/Progesteron-Verhältnis ist also sehr weit.
Es sei erwähnt, daß bei Primaten das Verhältnis mit etwa 1:50 um ein Vielfaches enger ist (GOOD & MOYER 1968). Östrogene Partialwirkungen von Gestagenen werden sich also bei einer Spezies wie der Ratte sehr viel eher manifestieren als bei Primaten oder bei der Frau. Dies zu wissen ist insofern von Bedeutung, als bei der Prüfung von derartigen Gestagenen in chronischen Verträglichkeitsstudien an Ratten östrogen-induzierte Effekte auftreten können, die für die Verhältnisse beim Menschen nur von sehr geringer oder fehlender Relevanz sind. Was die Milchdrüse anbelangt, so muß in chronischen Verträglichkeitsstudien mit derartigen Gestagenen immer mit einer übermäßigen Stimulierung des tubulo-alveolären Wachstums gerechnet werden. Auf der Basis einer chronischen Überstimulierung kann es bei der toxikologischen Prüfung von Gestagenen mit östrogenen Partialwirkungen zum Auftreten von Tumoren der Milchdrüse kommen. Es ist nach dem Vorhergesagten verständlich, daß derartige Befunde für die Verhältnisse bei Primaten kaum relevant sind. Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß die Kenntnisse über den mammotropen Hormonkomplex bei Primaten noch sehr lückenhaft sind.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Unter der Ausschaltung der endogenen Sexualhormone wurde bei weiblichen Ratten die synergistische Wirkung von Progesteron und Prolactin auf die Milchdrüsenentwicklung untersucht. Folgende Parameter wurden herangezogen:

I. Serum-Prolactin-Bestimmung
II. Hypophysengewichte
III. "Whole-mount"-Präparation
IV. Milchdrüsenhistologie
V. Milchdrüsengewichte
VI. DNS-Bestimmung

2. Die Ergebnisse der "whole-mount"-Präparation, der Milchdrüsenhistologie und der DFFT (dry fat free tissue) stimmen mit den Werten der DNS-Bestimmung gut überein.

3. Die Serumprolactinwerte und die Hypophysengewichte, die höchstwahrscheinlich auf eine Vermehrung der prolactin-produzierenden Zellen der Adenohypophyse beruhen, steigen mit erhöhten Östrogendosen an.

4. Östrogene können erst dann tubulo-alveoläres Milchdrüsenwachstum stimulieren, wenn sie in Dosen verabfolgt werden, die die Prolactinsekretion stimulieren. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß Östrogene nur via Stimulierung der Prolactinsekretion das tubulo-alveoläre Wachstum der Milchdrüsen von Ratten zu stimulieren vermögen.

5. Es bestehen keine Korrelationen zwischen dem tubulo-alveolären Wachstum der Milchdrüse und den Serumprolactinwerten.

6. Niedrige Östrogendosen, die allein verabfolgt weder die Prolactinsekretion noch das tubulo-alveoläre Wachstum der Milch-

drüsen stimulieren, führen in Kombination mit Progesteron zu einem starken tubulo-alveolären Milchdrüsenwachstum. Offenbar sind basale Prolactinspiegel ausreichend, um in Kombination mit Progesteron tubulo-alveoläres Wachstum der Milchdrüsen zu induzieren. Dies deutet auf einen Prolactin-Progesteron-Synergismus hin.

7. Die östrogene Partialwirkung des Norethynodrels ist an der Erhöhung der Serumprolactinspiegel und an dem Milchdrüsenwachstum deutlich zu erkennen. Das synergistische Zusammenwirken der beiden Partialwirkungen (östrogene und gestagene) des Norethynodrels auf das tubulo-alveoläre Milchdrüsenwachstum ist offensichtlich. Norethynodrel verhielt sich also hinsichtlich seiner Wirkung auf die Rattenmilchdrüse wie eine entsprechende Progesteron/Östrogen-Kombination.
Letztlich liegt auch hier ein Progesteron-Prolactin-Synergismus vor.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Ahren, K.:
Effect of insulin on body growth and mammary gland development in force-fed hypophysectomized rats injected with ovarian hormones.
Acta endocr. (Kbh.) 30, 593 (1959 a)

Ahren, K.:
The effect of various doses of estrone and progesterone on the mammary gland of castrated hypophysectomized rats injected with insulin.
Acta endocr. (Kbh.) 30, 435 (1959 b)

Ahren, K., and M. Etienne:
Stimulation of mammary glands in hypophysectomized male rats treated with ovarian hormones and insulin.
Acta endocr. (Kbh.) 28, 89 (1958)

Ahren, K., and M. Etienne:
The effect of testosterone alone and combined with insulin on the mammary glands of castrated and hypophysectomized rats.
Acta endocr. (Kbh.) 30, 109 (1959)

Ahren, K., and D. Jacobsohn:
Mammary gland growth in hypophysectomized rats injected with ovarian hormones and insulin.
Acta physiol. scand. 37, 190 (1956 a)

Allen, E., and O. Wintersteiner:
Crystalline progestin.
Science 80, 190 (1934)

Amann, W. und G. Spanknebel:
Rückbildung von Acne vulgaris bei Gabe eines Antikonzipien
Z. Haut- u. Geschl.-Kr. 36, 225 (1964)

Amenomori, Y., C.L. Chen, and J. Meites:
Serum prolactin levels in rats during different reproductive states.
Endocr. 86, 506 (1970)

Arimura, A., T. Saito, E.E. Müller, C.Y. Bowers, S. Sawano, and A.V. Schally:
Absence of prolactin-release inhibiting activity in highly purified LH-releasing factor.
Endocr. 80, 972 (1967)

Astwood, E.B.:
The regulation of corpus luteum function by hypophysial luteotrophin.
Endocr. 28, 309 (1941)

Baker, B.L., R.H. Kahn, and D. Besemer:
Ovarian histology after treatment of rats with norethynodrel.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119, 527 (1965)

Barrnet, R.J., W.D. Roth, and J. Saizer:
The histochemical demonstration of the sites of luteotropic hormone in the rat pituitary gland.
Endocr. 69, 1047 (1961)

Ben-David, M., S. Dikstein, and F.G. Sulman:
Effect of different steroids on prolactin secretion in pituitary-hypothalamo organ co-culture.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 117, 511 (1964)

Benson, G.K., A.T. Cowie, S.J. Folley, and J.S. Tindall:
Recent developments in endocrine studies on mammary growth and lactation.
In: Lloyd, C.W. (Ed.) "Recent Progress in the Endocrinology of Reproduction", P. 457,
New York and London: Academic Press (1959)

Benson, G.K., A.T. Cowie, C.P. Cox, D.S. Flux, and S.J. Folley:
Studies on the hormonal induction of mammary growth and lactation in the goat.
II. Functional and morphological studies of hormonally developed udders with special reference to the effect of triggering doses of oestrogen.
J. Endocr. 13, 46 (1955)

Benson, K.G., A.T. Cowie, C.P. Cox, and S.A. Goldzveig:
Effects of estrone and progesterone on mammary gland development in the guinea-pig.
J. Endocr. 15, 126 (1957)

Berson, S.A., and R.S. Yallow:
Immunochemical heterogenity of parathyroid hormone in plasma.
J. clin. Endocrinol. Metab. 28, 1037 (1968)

Butenandt, A., U. Westphal und W. Holweg:
Über das Hormon des Corpus luteum.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 227, 84 (1934)

Chen, C.L., Y. Amenomori, K.H. Lu, J.L. Voogt, and J. Meites:
Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions.
Neuroendocr. 6, 220 (1970)

Chen, C.L., and J. Meites:
Effects of estrogen and progesterone on pituitary and serum prolactin levels as measured by radioimmunoassay.
Fed. Proc. 28, 505 (1969)

Chen, C.L., H. Minaguchi, and J. Meites:
Effects of transplanted pituitary tumors on host pituitary prolactin secretion.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 126, 317 (1967)

Chowers, I., and S.M. McCann:
Comparison of the effect of hypothalamic and pituitary implants of estrogen, testosterone on reproductive systems and adrenal of female rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 124, 260 (1967)

Clifton, K.H., and J. Furth:
Ducto-alveolar growth in mammary glands of adrenogonadectomized male rats bearing mammotropic pituitary tumors.
Endocr. 66, 893 (1960)

Cole, H.A.:
The mammary gland of the mouse, during the oestrous cycle, pregnancy and lactation.
Proc. Roy. Soc. B 114, 136 (1933)

Cowie, A.T.:
The relative growth of the mammary gland in normal, gonadectomized and adrenalectomized rats.
J. Endocr. 6, 145 (1949)

Cowie, A.T., and W.R. Lyons:
Mammogenesis and lactogenesis in hypophysectomized, adrenalectomized, ovarectomized rats.
J. Endocr. 19, 29 (1959)

Cowie, A.T., and S.J. Folley:
The mammary gland and lactation.
In: Young, W.C. (Ed.) "Sex and Internal Secretions", P. 590
Baltimore: Williams and Wilkins Co. (1961)

Cowie, A.T., S.J. Folley, F.H. Malpress, and K.C. Richardson:
Studies of the hormonal induction of mammary growth and lactation in the goat.
J. Endocr. 8, 64 (1952)

Cowie, A.T., J.S. Tindall, and A. Yokoyama:
The induction of mammary growth in the hypophysectomized goat.
J. Endocr. 34, 185 (1966)

Curtis, C.:
Factors influencing lobulo-alveolar development and mammary secretion in the rat.
Endocr. 45, 284 (1949)

Dao, T.L., and D. Gawlak:
Direct mammotrophic effect of a pituitary homograft in rats.
Endocr. 72, 884 (1963)

Desclin, L.:
Interaction between prolactin and progesterone in the regulation of the secretory processes in the mammary glan
Ciba Found. Coll. on Endocr. 4, 395 (1952)

De Voe, W.F., V.D. Ramirez, and S.M. McCann:
Induction of mammary secretion by hypothalamic lesions in male rats.
Endocr. 78, 158 (1966)

Dharival, A.P.S., C.E. Grosvenor, J. Antunes-Rodrigues, and S.M. McCann:
Studies on the purification of ovine prolactin-inhibiting-factor.
Endocr. 82, 1236 (1968)

Drill, V.A.:
Biological effects of some steroids with progestational activity.
Fed. Proc. 18, 1040 (1959)

Drill, V.A.:
Endocrine properties of norethynodrel and related steroids
J. Endocr. 24, XVII (1962)

Drill, V.A., and B. Riegel:
Structural and hormonal activity of some new steroids.
Rec. Progr. Horm. Res. 14, 29 (1958)

Emmart, E.W., R.W. Bates, and W.A. Turner:
Localization of prolactin in rat pituitary and in a transplantable mammotropic pituitary tumor using fluorescent antibody.
J. Histochem. Cytochem. 13, 182 (1965)

Everett, J.W.:
Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rat hypophysea.
Endocr. 58, 786 (1956)

Everett, J.W.:
Central neural control of reproductive function of the adenohypophysis.
Physiol. Rev. 44, 373 (1964)

Farquar, M.G., and J.F. Rinehart:
Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrated rats.
Endocr. 54, 516 (1954)

Ferguson, D.J.:
Endocrine control of mammary glands in C_3H mice.
Surgery 39, 30 (1956)

Finnerud, C.W. und J.D. McGrae jr.:
Enovid in der Acnetherapie.
Hautarzt 15, 677 (1964)

Flux, D.S.:
Growth of the mammary duct system in intact and ovariectomized mice of the CHI strain.
J. Endocr. 11, 223 (1954)

Flux, D.S.:
Mammary gland growth in male mice of the CHI strain after hypophysectomy and castration.
J. Endocr. 17, 300 (1958)

Folley, S.J.:
Endocrine control of the mammary gland.
I. Mammary development.
Brit. Med. Bull. 5, 130 (1947 a)

Folley, S.J.:
Recent researches on the physiology of mammary development and lactation.
Proc. Roy. Soc. B 40, 37 (1947 b)

Folley, S.J.:
Aspects of pituitary-mammary gland relationships.
Rec. Progr. Horm. Res. 7, 107 (1952)

Folley, S.J.:
Hormones in mammary growth and function.
Brit. Med. Bull. 11, 145 (1955)

Folley, S.J.:
The physiology and biochemistry of lactation.
Edinburgh: Oliver & Boyed (1956)

Freyer, M.E., and H.M. Evans:
Participation of the mammary gland in the changes of pseudopregnancy in the rat.
Anat. Rec. 25, 108 (1923)

Gardner, W.U.:
Growth of the mammary glands in hypophysectomized mice.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 45, 835 (1940)

Gardner, W.U.:
Experiments on mammary growth in hypophysectomized and intact male mice.
Anat. Rec. (Suppl. 1) 79, 23 (1941)

Gardner, W.U., and A. White:
Mammary growth in hypophysectomized male mice receiving estrogen and prolactin.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 48, 590 (1941)

Girod, C.:
Identification expérimentale de cellules du E, source de prolactine, dans l'antéhypophyse du Sing Macacus Sylvanus L.
Compt. Rend. Soc. Biol. 156, 845 (1962)

Gomez, E.T.:
Mammary gland in hypophysectomized castrated guinea pigs.
Endocr. 31, 613 (1942)

Good, R.G., and D.L. Moyer:
Estrogen-progesterone relationship in the development of secretory endometrium.
Fertil. and Steril. 19, 37 (1968)

Greenwood, F.C., W.M. Hunter, and J.S. Glover:
The preparation of J^{131} labelled human growth hormone of high specific radioactivity.
Biochem. J. 89, 114 (1963)

Griffith, D.R., and C.W. Turner:
Desoxyribonucleic acid (DNA) content of mammary gland during pregnancy and lactation.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 95, 347 (1957)

Griffith, D.R., and C.W. Turner:
Normal growth of rat mammary glands during pregnancy and early lactation.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 106, 448 (1961)

Grosvenor, C.E., F. Mena, A.P.S. Dharival, and S.M. McCann:
Reduction of milk secretion by prolactin-inhibiting-factor; further evidence that exteroceptive stimuli can release pituitary prolactin in rats.
Endocr. 81, 1021 (1967)

Grosvenor, C.E., S.M. McCann, and R. Nallar:
Inhibition of nursing-induced and stress-induced fall in pituitary prolactin concentration in lactating rats by injections of acid extracts of bovine hypothalamus.
Endocr. 76, 883 (1965)

Grosvenor, C.E., and C.W. Turner:
Assay of lactogenic hormone.
Endocr. 63, 530 (1958)

Grosvenor, C.E., F. Mena, and D. Schaefgen:
Effect of nonsuckling interval and duration of suckling on the suckling-induced fall in pituitary prolactin concentration in the rat.
Endocr. 81, 449 (1967)

Grumbach, M.M., J.R. Ducharme, and R.E. Moloshok:
On the fetal masculinizing action of certain oral progestins.
J. clin. Endocr. 19, 1369 (1959)

Hahn, D.W., and C.W. Turner:
Effect of oestrogen and progesterone on mammary gland DNA and feed intake in hypophysectomized female rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 122, 183 (1966)

Hardfield, G., and S. Young:
The controlling influence of the pituitary on the growth of the normal breast.
Brit. J. Surg. 46, 265 (1958)

Hales, C.N., and P.J. Randle:
Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate
Biochem. J. 88, 137 (1963)

Hammerstein, J.:
Theoretische Grundlagen der hormonalen Kontrazeption.
Med. Klin. 65, 1279 (1970)

Harkness, M.L.R., and R.D. Harkness:
The effect of pregnancy and lactation on the collagen content of the mammary gland of the rat.
J. Physiol. (Lond.) 132, 476 (1956)

Hartmann, M. und A. Wettstein:
Ein kristallisiertes Hormon aus Corpus luteum.
Helv. Chim. Acta 17, 878 (1934)

Herlyn, U., H.F. Gellep, L. von Berswordt-Wallrabe, and R. von Berswordt-Wallrabe:
Pituitary lactogenic hormone release during onset of pseudopregnancy in intact rats.
Acta endocr. (Kbh.) 48, 220 (1965)

Höhn, E.D.:
The effect of oestrone on the mammary gland of adrenalectomized guinea-pigs.
J. Endocr. 16, 227 (1957)

Huggins, C., and P.V. Moulder:
Studies on the mammary tumors of dogs.
I. Lactation and the influence of ovariectomy and suprarenalectomy thereon.
J. exp. Med. 80, 441 (1944)

Huxley, J.S., and G. Teissier:
Terminology of relative growth.
Nature 137, 780 (1936)

Hymer, W.C., W.H. McShann, and R.G. Christiansen:
Electron microscopic studies of the anterior pituitary glands from lactating and oestrogen-treated rats.
Endocr. 69, 81 (1961)

Jacobsohn, D.:
Action of estradiol monobenzoate on the mammary gland of hypophysectomized rabbits.
Acta physiol. scand. 32, 304 (1954)

Jacobsohn, D.:
Mammary gland growth in relation to hormones with metabolic actions.
Proc. Roy. Soc. B 149, 325 (1958)

Junkmann, K.:
Experimentelle Gesichtspunkte bei der Prüfung synthetischer Gestagene.
Deut. Med. Wschr. 88, 629 (1963)

Kahn, R.H., and B.L. Baker:
Effect of norethynodrel alone or combined with mestranol on the mammary glands of the adult female rat.
Endocr. 75, 818 (1964)

Kahn, R.H., B.L. Baker, and D.B. Zanotti:
Factors modifying the stimulatory action of norethynodrel on the mammary gland.
Endocr. 77, 162 (1965)

Kanematsu, S., J. Hilliard, and C.H. Sawyer:
Effect of reserpine on pituitary prolactin content and its hypothalamic site of action in the rabbit.
Acta endocr. (Kbh.) 44, 467 (1963)

Kanematsu, S., and C.H. Sawyer:
Effect of intrahypothalamic and intrahypophysial estrogen implants on pituitary prolactin and lactation in the rabbit.
Endocr. 72, 243 (1963)

Krikham, W.R., and C.W. Turner:
Nucleic acids of the mammary glands of rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 83, 123 (1953)

Kirkham, W.R., and C.W. Turner:
Induction of mammary growth in rats by estrogen and progesterone.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 87, 139 (1954).

Klopper, A.:
A clinical comparison of progestational compounds.
Anglo-Germ. med. Rev. 1, 414 (1962)

Kobayashi, T., T. Kobayashi, T. Kigawa, M. Mizuno, and Y. Amenomori:
Prolactin secretion of rat anterior pituitary cultivated in vitro.
Endocrinol. Japon. 10, 199 (1963)

Koziorowska, J.:
Influence of hormones on mouse mammary glands cultured in vitro.
Acta Unio Internat. Contra Cancrum 18, 211 (1962)

Kumaresan, P., and C.W. Turner:
Effect of growth hormone and thyroxine on mammary gland growth in the rat.
J. Dairy Sci. 48, 592 (1965)

Kumaresan, P., and C.W. Turner:
Effect of insuline and alloxan on mammary gland growth in rats.
J. Dairy Sci. 48, 1378 (1965)

Kumaresan, P., and C.W. Turner:
Effect of various hormones on mammary gland growth of ovariectomized rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 125, 556 (1967)

Kuroshima, A., A. Arimura, C.Y. Bowers, and V.A. Schally:
Inhibition by pig hypothalamic extracts of depletion of pituitary prolactin in rats following cervical stimulation
Endocr. 78, 216 (1966)

Leonard, S.L.:
Stimulation of mammary glands in hypophysectomized rats by estrogen and testosterone.
Endocr. 32, 229 (1943)

Leonard, S.L., and R.P. Reece:
Failure of steroid hormones to induce mammary growth in hypophysectomized rats.
Endocr. 30, 32 (1942)

Lyons, W.R., and R.E. Johnson:
Embedding stained mammary glands in plastic.
Stain. Technol. 28, 201 (1952)

Lyons, W.R., C.H. Li, R.D. Cole, and R.E. Johnson:
Some of the hormones required by the mammary gland in its development and function.
J. clin. Endocr. 13, 836 (1953)

Lyons, W.R., C.H. Li, and R.E. Johnson:
The enhancing effect of somatotropin on the mammary growth induced in rats with estrin, progestin and mammatropin.
J. clin. Endoc. 16, 967 (1953)

Lyons, W.R., and D.A. McGinty:
Effects of estrone and progesterone on male rabbit mammary glands. I. Varying doses of progesterone.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48, 83 (1941)

Lyons, W.R., and R.I. Pencharz:
Reactions of mammary glands of normal and hypophysectomized male guinea-pigs to female sex hormone.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 33, 589 (1936)

Lyons, W.R., M.E. Simpson, and H.M. Evans:
Hormonal requirement for pregnancy and mammary development in hypophysectomized rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 52, 134 (1943)

Marshall, F.H.A., and E.T. Halnan:
On the post-oestrous changes occurring in the generative organs and mammary glands of the non-pregnant dog.
Proc. Roy. Soc. B 89, 546 (1917)

Mayer, G., and M. Klein:
Histology and cytology of the mammary gland.
In: Kon, S.K. and A.T. Cowie (Eds.) "Milk: The Mammary Gland and its Secretion", Chapt. 2,
New York: Academic Press (1960)

McCann, S.M., and H.M. Friedmann:
The effect of hypothalamic lesions on the secretion of luteotropin.
Endocr. 67, 597 (1960)

Meites, J.:
Recent studies on the mechanism controlling the initiation of lactation.
Rev. Canad. Biol. 13, 359 (1954)

Meites, J.:
Control of mammary growth and lactation.
In: Martini, W. and Ganong, W.F. (Eds.)
"Neuroendocrinology",
Vol. I, Chapt. 16,
New York and London: Academic Press (1966)

Meites, J., and C.L. Kragt:
Effects of a pituitary hormon transplant and thyroxine on body and mammary growth in immature hypophysectomized rats.
Endocr. 75, 565 (1964)

Meites, J., and C.S. Nicoll:
In vivo and in vitro effects of steroids on pituitary prolactin secretion.
Proc. 1st Int. Congr. Hormone Steroid 5, 307 (1965)

Meites, J., and C.S. Nicoll:
Adenohypophysis: Prolactin.
Annual Review of Physiology 28, 57 (1966)

Meites, J., and C.W. Turner:
Studies concerning the mechanisms controlling the initiation of lactation at parturition.
Endocr. 30, 711 (1942)

Mena, F., H. Maiweg, and C.E. Grosvenor:
Effect of ectopic pituitary glands upon prolactin concentration by the in situ pituitary of the lactating rat.
Endocr. Springfield 83, 1359 (1968)

Miescher, K.:
On the relation of activity to constitution in the sex-organs, with special reference to the doisynolic acids.
Rec. Progr. Horm. Res. 3, 47 (1948)

Minaguchi, H., J.A. Clemens, and J. Meites:
Changes in pituitary prolactin levels in rats from weaning to adulthood.
Endocr. 82, 555 (1968)

Minaguchi, H., and J. Meites:
Effects of a norethynodrel-mestranol combination (Enovid) on hypothalamic and pituitary hormones in rats.
Endocr. 81, 826 (1967)

Minaguchi, H., and J. Meites:
Effect of suckling on hypothalamic LH-releasing-factor and prolactin-inhibiting-factor, and on pituitary LH and prolactin.
Endocr. 80, 603 (1967)

Mirsky, A.E., and H. Ris:
Variable and constant components of chromosomes.
Nature (Lond.) 163, 666 (1949)

Mishkinsky, J., Z.K. Lajtos, and F.G. Sulman:
Initiation of lactation by hypothalamic implantation of perphenazine.
Endocr. 78, 919 (1966)

Mixner, J.P., and C.W. Turner:
Role of estrogen in the stimulation of mammary lobulo-alveolar growth by progesterone and by the mammogenic lobulo-alveolar growth factor of the anterior pituitary.
Endocr. 30, 591 (1942 a)

Mixner, J.P, and C.W. Turner:
Influence of thyroxine upon mammary lobulo-alveolar growth
Endocr. 31, 345 (1942 b)

Mixner, J.P., and C.W. Turner:
The mammogenic hormones of the anterior pituitary.
II. The lobulo-alveolar growth factor.
Mo. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 378 (1943)

Mizuno, H., K. Ilda, and M. Naito:
The role of prolactin in the mammary alveolus formation.
Endocr. Japon. 2, 163 (1955)

Mizuno, H., and M. Naito:
The effect of locally administered prolactin on the nucle acid content of the mammary gland in the rabbit.
Endocr. Japon. 3, 227 (1956)

Moon, R.C., D.R. Griffith, and C.W. Turner:
Normal and experimental growth of rat mammary gland.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 101, 788 (1959)

Munford, R.E.:
A review of anatomical and biochemical changes in the mammary gland with particular reference to quantitative methods of assessing mammary development.
J. Dairy Sci. Abstr. 26, 293 (1964)

Munford, R.E.:
Changes in the mammary glands of rats and mice during pregnancy, lactation and involution. III. Relation of structural and biochemical changes.
J. Endocr. 28, 35 (1963)

Myers, J.A.:
Studies on the mammary gland. I. The growth and distribution of the milk-ducts and the development of the nipple in the albino rat from birth to ten weeks of age.
Amer. J. Anat. 19, 353 (1916)

Myers, J.A.:
Studies on the mammary gland. III. A comparison of the developing mammary glands in male and female albino rats from the late fetal stages to ten weeks of age.
Anat. Rec. 13, 205 (1917)

Myers, J.A.:
Studies on the mammary gland. IV. The histology on the mammary gland in male and female albino rats from birth to ten weeks of age.
Amer. J. Anat. 25, 395 (1919)

Myers, J.A.:
Studies on the mammary gland. V. The effects of inanition on the developing mammary glands in male and female albino rats from birth to ten weeks of age.
Anat. Rec. 16, 159 (1919)

Nathanson, I.T., D.T. Shaw, and C.C. Franseen:
Effect of simultaneous administration of growth complex and estradiol on mammary gland of hypophysectomized rat.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 42, 652 (1939)

Neumann, F.:
Chemische Konstitution und pharmakologische Wirkung.
In: Junkmann, K. (Ed.) "Gestagene", Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 22/1, Kap. VI, p.680, Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag (1968)

Neumann, F. und W. Elger:
Methodik der Steroidtoxikologie.
Arbeitstagung in Bonn 1970 "Kritische Überlegungen zu den biologischen Grundlagen von Toxizitätsstudien mit Steroid-(Sexual)Hormonen",
Stuttgart: Georg Thieme Verlag (1971)

Nicoll, C.S., and J. Meites:
Estrogen stimulation of prolactin production by rat adenohypophysis in vitro.
Endocr. 70, 272 (1962)

Nicoll, C.S., and J. Meites:
Prolactin secretion in vitro: Effects of gonadal and adrenal cortical steroids.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 117, 579 (1964)

Nikitovitch-Winter, M.B.:
Effect of hypophysial stalk transection on luteotropic hormone secretion in the rat.
Endocr. 77, 658 (1965)

Nikitovitch-Winter, M.B., and J.W. Everett:
Comparative study of luteotropin secretion by hypophysial autotransplants in the rat. Effects of site and stages of the estrus cycle.
Endocr. 62, 522 (1958)

Nishino, Y. und F. Neumann:
Untersuchungen zur östrogenen und antiöstrogenen Wirkung von Gestagenen, gemessen am Sialinsäuregehalt der Mäusevagina.
17. Symp. d. Dtsch. Gesellschaft für Endokrinologie, Hamburg (1971)

Petersen, W.G., C.B. Knodt, T.M. Ludwick, and B.S. Pomeroy:
Mammary development in the thyroprived bovine by stilbestrol and thyroprotein administration.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 57, 332 (1944)

Pincus, G., M.C. Chang, M.X. Zarrow, E.S.E. Hafez, and A. Merrill:
Studies of the biological activity of certain 19-nor-steroids in female animals.
Endocr. 59, 695 (1956)

Pincus, G., M.C. Chang, E.S.E. Hafez, M.X. Zarrow, and A. Merrill:
Effects of certain 19-nor-steroids on reproduction processes in animals.
Science 124, 890 (1956)

Ramirez, V.D., and S.M. McCann:
Induction of prolactin secretion by implants of oestrogen into the hypothalamo-hypophysial region of female rats.
Endocr. 75, 206 (1964)

Ratner, A., and J. Meites:
Depletion of prolactin inhibiting activity of rat hypothalamus by estradiol or suckling stimulus.
Endocr. 75, 377 (1964)

Ratner, A., P.K. Talwalker, and J. Meites:
Effect of estrogen administration in vivo on prolactin release by rat pituitary in vitro.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 112, 12 (1963)

Reece, R.P.:
Mammary gland development and function.
In: Velardo, J.T. (Ed.) "The Endocrinology of Reproduction", p. 213,
New York and Oxford: University Press (1958)

Reece, R.P., and J.A. Bivins:
Progesterone effect on pituitary lactogen content and on mammary glands of ovary-ectomized rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 49, 582 (1942)

Reece, R.P., and J.H. Leathem:
Growth of mammary glands of hypophysectomized rats following estrogen and lactogen administration.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 59, 122 (1945)

Reece, R.P., and S.L. Leonard:
Further evidence for a mammogenic factor in the rat hypophysis.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 42, 200 (1939)

Reece, R.P., and S.L. Leonard:
Effect of oestrogens, gonadotropins and growth hormone on mammary glands of hypophysectomized rats.
Endocr. 29, 297 (1941)

Reece, R.P., and S.L. Leonard:
Lobulo-alveolar growth of mammary glands of hypophysectomized female rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 49, 660 (1942)

Reece, R.P., C.W. Turner, and R.T. Hill:
Mammary gland development in the hypophysectomized albino rat.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 34, 204 (1936)

Rennels, E.G.:
An electron microscope study of pituitary autograft cell in the rat.
Endocr. 71, 713 (1936)

Richardson, F.L.:
The relative growth of the mammary gland in normal ovariectomized and ovariectomized adrenalectomized mice.
Anat. Rec. 123, 279 (1955)

Rothchild, I., and R. Dickey:
The corpus luteum - pituitary relationship: a study of the compensatory hypertrophy of the ovary during pseudopregnancy and lactation in the rat.
Endocr. 67, 42 (1960)

Samuels, L.T., R.M. Reinecke, and W.E. Petersen:
Relation of nutrition to mammary growth after estradiol administration to hypophysectomized rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 46, 379 (1941)

Sar, M., and J. Meites:
Changes in pituitary prolactin release and hypothalamic PIF-content during the estrous cycle of rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 125, 1018 (1967)

Sar, M., and J. Meites:
Effects of progesterone, testosterone and cortisol on hypothalamic PIF and pituitary prolactin content.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 127, 426 (1968)

Sar, M., and J. Meites:
Effects of suckling on pituitary release of prolactin, GH and TSH in postpartum lactating rats.
Neuroendocr. 4, 25 (1969)

Saunders, F.J., and V.A. Drill:
Some biological activities of 17-ethynyl and 17-alkyl derivatives of 17-hydroxyestrenones.
Anx. N.Y. acad. Sci. 71, 516 (1958)

Sawyer, C.H., C.K. Hahn, J. Hilliard, H.M. Radford, and S. Kanematsu:
Further evidence for the identity of hypothalamic areas controlling ovulation and lactation in the rabbit.
Endocr. 73, 338 (1963)

Scharf, G., and W.R. Lyons:
Effect of estrone and progesterone on male rabbit mammary glands. II. Varying doses of estrone.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 48, 86 (1941)

Schneider, W.G.:
Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid.
J. Biol. Chem. 161, 293 (1945)

Schultze, A.B., and C.W. Turner:
Experimental initiation of milk secretion in the albino rat.
J. Dairy Sci. 16, 129 (1933)

Silver, M.:
A quantitative analysis of the role of oestrogen in mammary development in the rat.
J. Endocr. 10, 17 (1953 a)

Silver, M.:
The onset of allometric mammary growth in the hooded norway rat.
J. Endocr. 10, 35 (1953 b)

Sinha, Y.N., and H.A. Tucker:
Mammary gland growth of rats between ten and hundred days of age.
Amer. J. physiol. 210, 601 (1966)

Sinha, Y.N., and H.A. Tucker:
Pituitary prolactin content and mammary development after chronic administration of prolactin.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 128, 84 (1968)

Slotta, K.H., H. Ruschig und E. Fels:
Reindarstellung der Hormone aus dem Corpus luteum.
Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1270 (1934)

Smith, T.C., and B. Richterich:
Progesterone and mammary gland growth in guinea pigs.
Anat. Res. 125, 597 (1956)

Smith, T.C., and B. Richterich:
Synergism of estrogen and progesterone on mammary gland growth in guinea pigs.
Endocr. 63, 89 (1958)

Smithcors, J.F., and S.L. Leonard:
Limited effects of certain steroids hormones on mammary glands of hypophysectomized rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 54, 109 (1943)

Sollmann, T. (Ed.):
"A Manual of Pharmacology, its Applications to Therapeutics and Toxicology", 8. Auflage,
Philadelphia, London: W.B. Saunders Comp. (1957)

Sulman, F.G., M. Ben-David, A. Dawon, S. Dikstein, N. Khazan, J. Mishkinsky, and V. Zor:
Studies on hypothalamic lactation. Investigations into the mechanism of lactation its augmentation by hypothalamic stimulation.
In: Research, Report 1963/1964,
Israel: The Hebrew University of Jerusalem (1963/1964)

Talwalker, P.K., and J. Meites:
Mammary lobulo-alveolar growth induced by hypophysectomized rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 107, 880 (1961)

Talwalker, P.K., and J. Meites:
Mammary lobulo-alveolar growth in adeno-ovariectomized rats following transplantation of "mammotropic" pituitary tumor.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 117, 121 (1964)

Talwalker, P.K., J. Meites, and H. Mizuno:
Mammary tumor induction by estrogen or anterior pituitary hormones in ovariectomized rats given 7,12-dimethyl-1,2-benzantracene.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 116, 531 (1964)

Thomsen, K. und J.H. Napp:
Nebenwirkungen bei hochdosierter Nortestosteron-Medikation in der Gravidität.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 20, 508 (1960)

Traurig, H.H., and C.F. Morgan:
Autoradiographic studies of the epithelium of mammary gland as influenced by ovarian hormones.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 115, 1076 (1964)

Tucker, H.A., M.J. Paape, and Y.N. Sinha:
Ovariectomy and suckling intensity effects on mammary nucleic acid, prolactin and ACTH.
Amer. J. Physiol. 213, 262 (1967)

Turner, C.W., and E.T. Gomez:
The normal and experimental development of the mammary gland. III. The male and female dog.
Mo. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 707 (1934)

Turner, C.W., and A.B. Schultze:
A study of the causes of the normal development of the mammary gland of the albino rat.
Mo. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 157 (1931)

Turner, C.W., R. Williams, and G.A. Hindery:
Growth of the udders of dairy heifers as measured by milk yield and DNA.
J. Dairy Sci. 46, 1390 (1963)

Ufer, J.:
Die therapeutische Anwendung der Gestagene beim Menschen.
In: Junkmann, K. (Ed.) "Gestagene", Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. XXII/I, p. 1026
Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag (1968)

Webb, J.M., and H.B. Levy:
A sensitive method for the determination of deoxyribonucleic acid in tissues and microorganisms.
J. Biol. Chem. 213, 107 (1955)

Weichert, C.K., R.W. Boyd, and R.S. Cohen:
A study of certain endocrine effects on the mammary glands of female rats.
Anat. Rec. 61, 21 (1934)

Welsch, C.W., A. Negro-Vilar, and J. Meites:
Effects of pituitary hormongrafts on host pituitary prolactin and hypothalamic PIF levels.
Neuroendocrinology 3, 238 (1968)

Wilkins, L., H.W. Jones jr., G.H. Holman, and R.S. Stempfel jr.:
Masculinization of the female fetus associates with administration of oral and intramuscular progestins during gestation: Non-adrenal female pseudohermaphrodism.
J. clin. Endocr. 18, 559 (1958)

Wilkins, L.:
Masculinization of the female fetus due to the use certain synthetic oral progestins during pregnancy.
Arch. Anat. micr. Morph. exp. Suppl. 48, 313 (1959)

Wilkins, L.:
Masculinization of female fetus due to use of orally progestins.
J. Amer. med. Ass. 172, 1028 (1960)

Williams, R., and C.W. Turner:
Growth of the calt udder using DNA as an index.
J. Dairy Sci. 44, 1721 (1961)

Wolthuis, O.L.:
An assay of prolactin based on a direct effect of this hormone on cells of the corpus luteum.
Acta endocr. (Kbh.) 42, 364 (1963 a)

Wolthuis, O.L.:
The effects of sex steroids on the prolactin content of hypophyses and serum in rats.
Acta endocr. (Kbh.) 43, 137 (1963 b)

Wolthuis, O.L., and S.E. de Jongh:
The prolactin production and release of a pituitary graft and of the hypophysis in situ.
Acta endocr. (Kbh.) 43, 271 (1963)

Yamamoto, H., and C.W. Turner:
Experimental mammary gland growth in rabbits by estrogen and progesteron.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 130 (1956)

Yochim, J.M., and V.J. de Feo:
Control of decidual growth in the rat by steroid hormones of the ovary.
Endocr. 71, 134 (1962)

VII. DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. F. Neumann danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die freundliche Beratung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Nishino für seine fortwährende Unterstützung, die mir immer wieder Mut gab, die vorhandenen Schwierigkeiten in Angriff zu nehmen.

Ich möchte mich auch sehr herzlich bei Fräulein Bauer, Frau Sperling, Herrn Hiller, Frau Bahr, Herrn Friedreich, Herrn Gröning, Herrn Leidecker und Frau Lenk bedanken, die durch ihre Hilfsbereitschaft und ihre Erfahrungen zur technischen Bewältigung der Arbeit beitrugen.

Auch bei den ungenannten Mitarbeitern der Abteilung Endokrinpharmakologie der SCHERING AG Berlin gilt meine Dankbarkeit für ihre freundliche Hilfe und ihre Bemühungen.

VIII. LEBENSLAUF

Ich wurde als erste Tochter von Kenkichi Mizonobe und seiner Ehefrau Tomi am 12. Februar 1942 in Osaka geboren.

Meine Kindheit verbrachte ich in Kochi und besuchte dort sechs Jahre Grundschule, drei Jahre Mittelschule und weitere drei Jahre Oberschule.
Danach studierte ich vier Jahre an der Hochschule für Pharmazie in Shizuoka.
1965 erhielt ich meine Approbation.

Seit 1966 lebe ich in Deutschland.
Im April 1969 habe ich mein Medizinstudium an der Freien Universität in Berlin angefangen.
Seit dem erfolgreichen Staatsexamen im August 1975 bin ich als Medizinalassistentin in verschiedenen Berliner Krankenhäusern und Kliniken tätig.